

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS**

Tesis Doctoral

**EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE MEZCLAS
COMPLEJAS MEDIANTE ENSAYOS ALTERNATIVOS A
LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE
GENOTOXICIDAD, MUTAGENICIDAD Y ECOTOXICIDAD**

Araceli Pillco Tito

Madrid, 2011

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE MEZCLAS COMPLEJAS MEDIANTE ENSAYOS ALTERNATIVOS A LA EXPERIMENTACIÓN ANIMAL DE GENOTOXICIDAD, MUTAGENICIDAD Y ECOTOXICIDAD

Memoria presentada por **Araceli Pillco Tito** para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores: Dr. Eduardo de la Peña de Torres (CSIC)
 Dra. M^a. José Hazen de San Juan (UAM)



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

M^a José Hazen de San Juan, Profesora Titular del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, certifica que Araceli Pillco Tito ha realizado el trabajo “Evaluación toxicológica de mezclas complejas mediante ensayos alternativos a la experimentación animal de genotoxicidad, mutagenicidad y ecotoxicidad” bajo su dirección.

Madrid, Mayo de 2010

Firmado:

Dra. Ma. José Hazen de San Juan



Eduardo de la Peña de Torres, Científico Titular del Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, certifica que Araceli Pillco Tito ha realizado el trabajo “Evaluación toxicológica de mezclas complejas mediante ensayos alternativos a la experimentación animal de genotoxicidad, mutagenicidad y ecotoxicidad” bajo su dirección.

Madrid, Mayo de 2010

Firmado:

Dr. Eduardo de la Peña de Torres

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Laboratorio de Mutagénesis Ambiental del Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

La financiación para este trabajo ha provenido de los proyectos:

- “Desarrollo y optimización de una estrategia de ensayos *in vitro* para la evaluación toxicológica de mezclas de contaminantes ambientales”. CICYT CTM2005-2135/TECNO.
- “Perfeccionamiento de una aproximación experimental *in vitro* para la evaluación de los mecanismos de acción toxica de contaminantes ambientales”. Ministerio de Ciencia e Innovación CTM2008-00311/TECNO.
- “Reducción del impacto Ambiental de subproductos agroindustriales mediante su empleo como biodesinfectantes para la sustitución de agroquímicos. Ministerio de Medio Ambiente OTT2007X1317.

También se ha contado con la ayuda de una beca pre-doctoral otorgada por el Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación y la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (MAEC-AECID) (2007-2011).

“La ciencia y la vida ni pueden ni deben estar separadas. Para mí la ciencia da una explicación parcial de la vida. Tal como es, se basa en los hechos, la experiencia y los experimentos...”

Rosalind Franklin
(1920-1958)



Agradecimientos

Hace más de 9 años, en Bolivia, cuando daba mis primeros pasos en el mundo científico, había escrito a una profesora de la Universidad de Oviedo, pidiéndole ayuda respecto a un tema de investigación. La respuesta fue cordial, inmediata y recibí más de lo había solicitado. Desde ese entonces se generó en mí, un entusiasmo por conocer algún día España. Quién diría que años más tarde ese sueño se haría realidad y empezaría a encontrarme con personas extraordinarias a quienes quiero expresarles mis sinceros agradecimientos:

A mi tutor, el Dr. Eduardo de la Peña de Torres, al que nunca podré corresponder como se merece tantos años de conocimiento y sabiduría empleados en mi formación. Por si no fuera suficiente la deuda de gratitud que con él tengo contraída, me ha distinguido al dirigir este trabajo, y me honra cada día con su afecto y trato personal. “Doc”, ¡gracias por ser un verdadero maestro!.

A la Dra. M^a José Hazen, por permitirme la oportunidad de realizar esta Tesis y por su disponibilidad y ayuda recibida en todo momento.

Al Dr. Alfredo Polo por su cordialidad y buenos consejos.

A la Dra. Diana Hernández quien pacientemente me ha enseñado, corregido y colaborado en varias etapas del trabajo.

A los miembros del Departamento de procesos termoquímicos de la Universidad de Zaragoza, con especial mención a Manuel Azuara.

A los miembros del Dpto. de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (Dres. Juan Carlos Illera, Gema Silvan y M^a del Mar Martínez, y D. Benedicto Jerónimo).

Al Ing. Carlos Lacasta de la finca experimental “La Higuera” y a Dn. Pedro Hernaiz de la finca experimental “La Poveda”.

A las personas que trabajan en el ICA-CSIC, que sin objeción alguna y desinteresadamente han colaborado mediante el préstamo de reactivos, equipos, toma de fotografías, análisis microscópico, caracterización química, análisis estadístico, incidencias informáticas, traducciones y valiosas sugerencias experimentales y personales. Por ello y sin orden de preferencia me gustaría nombrar a: Antonia Martínez, Antonio Bello, Cesar Morcillo, Cesar Garrido, Cesar Plaza, Clara Rodríguez, Consuelo

Fortún, Elena Fernández, Fernando Pinto, Gloria Nombela, Gonzalo Almendros, Isabel Haller, Jacek Wierzchos, José Antonio Flores, Luis Cuadra, Luis Santos, Manuel Benitez, M^a Asunción de los Ríos, M^a Esther García, Margarita Sacristán, Sagrario Fernández, Mercedes Fernández, Mercedes Lucas, Octavio Cedenilla, Pedro Soler, Rubén Badenes, Sergio Pérez, Víctor Franco. ¡Gracias a todos!.

Al Dr. Eduardo Gonzales y a Ana Paula Jiménez, por su colaboración mientras duro mi estancia en la Universidad Mayor de San Andrés

A la Dra. Paulina Benito de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

A Carmen González-Posada, quizá la persona más atareada que he conocido, pero que desde el primer momento brinda un apoyo especial a los estudiantes extranjeros que llegamos a la UAM. ¡Qué suerte haberte conocido Maki!.

A las Dras. Luisa M^a Sierra, Sonia Aguayo, Guillermina Font, M^a. José González, Paloma Fernández, Carmen Barrueco e Isabel Berruguete, por su tiempo para las correcciones y sugerencias.

A Oscar Herrero, por sus enseñanzas en la parte inicial de este trabajo.

A mis amigos de siempre, Mauricio, Pseydi, Mónica. ¡Quién iba a pensar que nos reencontraríamos en el viejo continente!, y a todas las personas que de una u otra forma me dieron sus palabras de aliento.

La distancia hace que se me haga un nudo en la garganta, cuando me llega el momento de agradecer a mis más grandes tesoros, mis padres Roberto y Liberata y mis hermanos Roberto y Danitza. Quiero que sepan que me han hecho mucha falta, pero su amor y palabras de apoyo a la distancia han sido mi alimento en estos casi 4 años.

Finalmente este país también me ha dado la dicha de haber conocido a mi compañero de camino, Rubén Casares. Amor!, gracias por soportarme en esos días malos, por darme ánimos, por tu paciencia, por tu cariño y por tener una familia maravillosa que ha hecho que me sienta como en casa.

*Llaqtakunaq atipayninwan
teqrimuyuta kuyuchisunchis.*

Índice

Contenido	Pag.
1. Introducción.....	1
1.2 Lodos de depuradora.....	4
1.2.1 Origen.....	4
1.2.2 Composición.....	4
1.2.3 Problemática actual.....	4
1.2.4 Destino.....	6
1.2.4.1 Aplicación en el suelo.....	6
1.2.4.2 Compostaje.....	7
1.2.4.3 Secado térmico.....	7
1.2.4.4 Valorización energética.....	8
1.3 Consideración de las mezclas en la legislación europea.....	9
1.4 Métodos alternativos a la experimentación animal.....	11
1.5 Ecotoxicología.....	12
1.6 Toxicología genética.....	15
1.6.1 Mutagenicidad en bacterias.....	16
1.6.2 Genotoxicidad.....	20
2. Objetivos.....	23
3. Material y métodos.....	25
3.1 Selección de las mezclas.....	25
3.1.1 Mezclas complejas relacionadas con la agricultura.....	27
3.1.1.1 Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora...	27
3.1.1.2 Suelos agrícolas enmendados con lodo de depuradora, lodo compostado y compost de RSU.....	28
3.1.1.3 Enmiendas agrícolas: lodos de depuradora, lodo compostado y compost de RSU.....	30
3.1.2 Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético.....	30
3.1.3 Mezclas complejas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora.	31
3.1.3.1 Líquidos de pirólisis sin fraccionar, obtenidos a partir de lodos de depuradora.....	31
3.1.3.2 Líquidos de pirólisis fraccionados, obtenidos a partir de lodos de	

depuradora.....	32
3.2 Preparación de muestras.....	32
3.2.1 Características físico químicas.....	32
3.2.1.1 pH.....	32
3.2.1.2 Conductividad eléctrica.....	32
3.2.1.3 Contenido de macroelementos	33
3.2.1.4 Determinación de microelementos.....	33
3.2.1.5 Preparación de extractos.....	34
3.3 Ensayos biológicos.....	34
3.3.1 Ensayo de germinación en semillas de <i>Lepidium sativum</i>	36
3.3.2 Ensayo de inhibición de luminiscencia en <i>Vibrio fischeri</i>	38
3.3.3 Ensayo de mutagenicidad en <i>Salmonella typhimurium</i>	41
3.3.3.1 Fundamento.....	41
3.3.3.2 Reactivos.....	41
3.3.3.3 Procedimiento método de incorporación en placa estándar.....	41
3.3.3.4 Procedimiento método de incorporación en placa con pre-incubación...	43
3.3.3.5 Procedimiento método incorporación en placa para líquidos volátiles....	44
3.3.3.6 Preparación de la fracción microsomal.....	44
3.3.3.7 Mezcla S9.....	45
3.3.3.8 Análisis estadístico.....	45
3.3.4 Ensayo de genotoxicidad en <i>Drosophila melanogaster</i>	46
3.3.4.1 Fundamento.....	46
3.3.4.2 Reactivos.....	47
3.3.4.3 Procedimiento.....	47
3.3.4.4 Análisis estadístico.....	50
4. Resultados.....	53
4.1 Características analíticas de las muestras.....	53
4.1.1 Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora.....	53
4.1.2 Suelos agrícolas.....	53
4.1.3 Enmiendas agrícolas: lodo secado térmicamente, lodo compostados y compost de RSU.....	54
4.1.4 Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético.....	55

4.1.5 Mezclas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora.....	56
4.2 Ensayos biológicos.....	57
4.2.1 Ensayo de germinación de semillas de <i>Lepidium sativum</i>	57
4.2.1.1 Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora...	57
4.2.1.2 Suelos agrícolas.....	58
4.2.1.3 Enmiendas agrícolas: lodo secado térmicamente, lodo compostado y compost de RSU.....	59
4.2.1.4 Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético.....	61
4.2.1.5 Mezclas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora.....	63
4.2.2 Ensayo de bioluminiscencia en <i>Vibrio fischeri</i>	65
4.2.2.1 Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora...	65
4.2.2.2 Suelos agrícolas.....	66
4.2.2.3 Enmiendas agrícolas: lodo secado térmicamente, lodo compostado y compost de RSU.....	67
4.2.2.4 Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético.....	68
4.2.2.5 Mezclas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora.....	69
4.2.3 Ensayo de mutagenicidad en <i>Salmonella typhimurium</i>	73
4.2.3.1 Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora...	73
4.2.3.2 Suelos agrícolas.....	74
4.2.3.3 Enmiendas agrícolas: lodo secado térmicamente, lodo compostado y compost de RSU.....	75
4.2.3.4 Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético.....	76
4.2.3.5 Mezclas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora.....	76
4.2.3.5.1 Ensayo de Incorporación en placa estándar.....	78
4.2.3.5.2 Ensayo de incorporación en placa con pre-incubación.....	82
4.2.3.5.3 Ensayo de incorporación en placa para líquidos volátiles.....	82
4.2.3.5.4 Fraccionamiento de los líquidos de pirólisis de origen industrial Madrid y urbano-Valladolid obtenidos a 530°C.....	85
4.2.4 Evaluación genotóxica mediante el ensayo SMART.....	88
4.2.4.1 Evaluación genotóxica del líquido de pirólisis Madrid mediante los	

cruces estándar y alta bioactivación.....	89
4.2.4.2 Evaluación genotóxica del líquido de pirólisis Valladolid mediante los cruces estándar y alta bioactivación.....	98
5. Discusión.....	99
6. Conclusiones.....	121
7. Bibliografía.....	123
Anexos.....	147

Índice de figuras

Figura 1.1 Comparación entre el efecto de compuestos simples y mezclas.....	3
Figura 1.2 Producción de lodos (miles de toneladas materia seca/año).....	5
Figura 3.1 Mezclas complejas seleccionadas para la valoración ecotóxica, mutagénica y genotóxica.....	26
Figura 3.2 Vista aérea de la finca experimental “La Poveda”.....	27
Figura 3.3 Lisímetro de succión.....	28
Figura 3.4 Vista aérea de la finca experimental “La Higuera”.....	28
Figura 3.5 Suelo control, suelos enmendado con compost y suelos enmendado con lodo secado térmicamente.....	29
Figura 3.6 Lodo de depuradora, compost de RSU, lodo compostado.....	30
Figura 3.7 Vista aérea de las estaciones depuradoras de aguas residuales Madrid Sur y Valladolid.....	31
Figura 3.8 Reactor de lecho fluidizado, condensadores, líquido de pirólisis.....	31
Figura 3.9 <i>Lepidium sativum</i> , semillas, radícula e hipocótilo.....	36
Figura 3.10 Esquema general de La prueba de toxicidad con semillas de <i>L. sativum</i>	37
Figura 3.11 <i>Vibrio fischeri</i> , pozo de incubación, luminómetro.....	38
Figura 3.12 <i>Salmonella typhimurium</i>	41
Figura 3.13 Esquema general del ensayo de incorporación en placa estándar.	42
Figura 3.14 Cámara para líquidos volátiles.....	44
Figura 3.15 Ratones <i>Mus musculus</i> , administración oral de β -naftoflavona, homogenizado de hígado.....	45
Figura 3.16 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	46
Figura 3.17 Morfología de las alas de la progénie heterocigota <i>mwh/TM3</i> y trans-heterocigota <i>mwh/flr³</i>	48
Figura 3.18 Marcadores fenotípicos normal, <i>mwh</i> y <i>flr³</i>	49
Figura 3.19 Sectores mutantes que se observan en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i>	50
Figura 4.1 Caracterización química de líquidos de pirólisis.....	56

Figura 4.2 Efecto de la adición de lixiviados sobre el índice de germinación de <i>L. sativum</i>	57
Figura 4.3 Efecto de la adición de extractos de suelos enmendados sobre el índice de germinación de <i>L. sativum</i>	58
Figura 4.4. Efecto de la adición de extractos de suelos enmendados sobre la longitud de la radícula e hipocótilo de <i>L. sativum</i>	59
Figura 4.5 Efecto de la adición de extractos enmiendas sobre el índice de germinación de <i>L. sativum</i>	60
Figura 4.6. Efecto de la adición de extractos de enmiendas sobre la longitud de la radícula e hipocótilo de <i>L. sativum</i>	61
Figura 4.7 Efecto de la adición de extractos de lodos destinados a valorización sobre el índice de germinación de <i>L. sativum</i>	62
Figura 4.8. Efecto de la adición de extractos de lodos destinados a valorización sobre la longitud de la radícula e hipocótilo de <i>L. sativum</i>	63
Figura 4.9 Efecto de la adición de líquidos de pirólisis sobre el índice de germinación de <i>L. sativum</i>	64
Figura 4.10. Efecto de la adición de líquidos de pirólisis sobre la longitud de la radícula e hipocótilo de <i>L. sativum</i>	65
Figura 4.11 Efecto de la adición de lixiviados sobre <i>Vibrio fischeri</i>	66
Figura 4.13 Efecto de la adición de extractos de suelos enmendados sobre <i>Vibrio fischeri</i>	67
Figura 4.14 Efecto de la adición de extractos enmiendas sobre <i>Vibrio fischeri</i>	68
Figura 4.14 Efecto de la adición de extractos de lodos destinados a valorización sobre <i>Vibrio fischeri</i>	69
Figura 4.15 Efecto de la adición de líquidos de pirólisis Madrid sobre <i>Vibrio fischeri</i>	70
Figura 4.16 Efecto de la adición de líquidos de pirólisis Valladolid sobre <i>Vibrio fischeri</i>	71
Figura 4.17 Efecto mutagénico de lodos	78
Figura 4.18 Efecto mutagénico de líquidos de pirólisis por el método IPE.....	82
Figura 4.19 Efecto mutagénico de líquidos de pirólisis por el método IPPI.....	83
Figura 4.20 Efecto mutagénico de líquidos de pirólisis por el método IPLV.....	84
Figura 4.21 Efecto mutagénico de las fases superior, media e inferior de	

líquido de pirólisis obtenido a 530°C.....	87
Figura 4.22 Frecuencia de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Madrid en el cruce estándar.....	92
Figura 4.23 Frecuencia de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Madrid en el cruce alta bioactivación.....	93
Figura 4.24 Frecuencia de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Valladolid en el cruce estándar.....	96
Figura 4.25 Frecuencia de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Valladolid en el cruce alta bioactivación.....	97

Índice de tablas

	Pag.
Tabla 1.1 Volumen de lodos de depuradora generados en España.....	5
Tabla 1.2 Destino de los lodos de depuración de aguas residuales.....	6
Tabla 1.3 Concentración máxima de metales pesados	8
Tabla 1.4 Subproductos que se obtienen durante el proceso de pirólisis.....	8
Tabla 1.5 Legislación de la U.E. relacionada con las mezclas químicas.....	9
Tabla 1.6 Normativa aplicable a los lodos de depuradora.....	10
Tabla 1.7 Ensayos ecotoxicológicos más empleados.....	13
Tabla 1.8 Clasificación de los principales ensayos de la toxicología genética...	17
Tabla 3.1 Resumen de los ensayos biológicos aplicados.....	35
Tabla 4.1 Caracterización físico-química del suelo	53
Tabla 4.2 Caracterización físico-química de enmiendas.....	54
Tabla 4.3 Caracterización físico-química de los lodos.....	55
Tabla 4.4 Grupos químicos presentes en los líquidos de pirólisis.....	56
Tabla 4.5 Índice de germinación por exposición a lixiviados.....	57
Tabla 4.6 Mutagenicidad de lixiviados de suelos enmendados con lodos.....	73
Tabla 4.7 Mutagenicidad de suelos enmendados	74
Tabla 4.8 Mutagenicidad de enmiendas.....	75
Tabla 4.9 Mutagenicidad de lodos destinados a valorización.....	77
Tabla 4.10 Mutagenicidad de líquidos de pirólisis.....	80
Tabla 4.11 Mutagenicidad empleando el método de IPPI.....	83
Tabla 4.12 Mutagenicidad empleado en método de IPLV.....	84
Tabla 4.13 Mutagenicidad de fases superior, media e inferior de líquidos de pirólisis.....	86
Tabla 4.14 Manchas inducidas por líquidos de pirólisis Madrid en el cruce estándar.....	90
Tabla 4.15 Manchas inducidas por líquidos de pirólisis Madrid en el cruce alta bioactivación.....	91
Tabla 4.16 Manchas inducidas por líquidos de pirólisis Valladolid en el cruce estándar.....	94
Tabla 4.17 Manchas inducidas por líquidos de pirólisis Valladolid en el cruce alta bioactivación.....	95

Abreviaturas

ADN	=	Ácido desoxirribonucleico
BPCs	=	Bifenilos policlorados
CE	=	Conductividad eléctrica
CE50	=	Concentración efectiva media
DDD		Dicloro difenil dicloroetano
DDT	=	Dicloro difenil tricloroetano
DEPB	=	Difenil éter polibromados
DMSO	=	Dimetil sulfóxido
DS	=	Desviación estándar
ECOPA	=	Plataforma Europea de Consenso em alternativas
ECVAM	=	Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos
EPA	=	Environmental Protection Agency
HPAs	=	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
IG	=	Índice de germinación
IM	=	Índice de mutación
IPE	=	Incorporación en placa estándar
IPPI	=	Incorporación en placa con pre-incubación
IPLV	=	Incorporación en placa para líquidos volátiles
L	=	Lodo secado térmicamente
LC	=	Lodo compostado
LM	=	Lodo de origen industrial - Madrid
LV	=	Lodo de origen urbano - Valladolid
MARM	=	Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino
MMC	=	Mitomicina C
MMS	=	Metil metano sulfonato
MSP	=	Manchas simples pequeñas
MSG	=	Manchas simples grandes
MG	=	Manchas gemelas
4NQO	=	4-nitroquinolina óxido
OCDE	=	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico
PVC	=	Cloruro de polivinilo
R	=	Número de colonias revertientes
REACH	=	Registro, evaluación y autorización de sustancias químicas

REMA	=	Red española de métodos alternativos
RSU	=	Resíduos sólidos urbanos
S9	=	Fracción microsomal
SMART	=	Test de mutación y recombinación somática
S+L	=	Suelo enmendado con lodo secado térmicamente
S+RSU	=	Suelo enmendado con compost de residuos sólidos urbanos
S+LC	=	Suelo enmendado con lodo compostado
TM	=	Total manchas

Resumen

Los seres vivos estamos expuestos a sustancias químicas que se encuentran agrupadas en forma de mezclas simples y mezclas complejas. Estas últimas están conformadas por decenas, cientos o miles de sustancias químicas, cuya composición es cualitativamente y cuantitativamente desconocida. La evaluación de los efectos tóxicos y la cuantificación de riesgos asociados a la exposición de mezclas químicas, es un desafío importante para los científicos, debido principalmente a la complejidad para comprender los efectos potenciales que pueden producir.

En este contexto el objetivo de este trabajo se centró en realizar evaluaciones toxicológicas de mezclas complejas, mediante métodos alternativos a la experimentación animal de ecotoxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad.

Las mezclas seleccionadas fueron divididas en tres grupos:

Grupo 1. Mezclas complejas relacionadas con la agricultura:

- Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora
- Suelos agrícolas enmendados con: lodo de depuradora, lodo compostado y compost de residuos sólidos urbanos.
- Enmiendas agrícolas: lodos de depuradora, lodo compostado y compost de residuos sólidos urbanos (RSU).

Grupo 2. Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético:

- Lodo procedente de una planta de depuración de aguas residuales urbanas.
- Lodo procedente de una planta de depuración de aguas residuales industriales.

Grupo 3. Mezclas complejas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora:

- Líquidos de pirólisis sin fraccionar, obtenidos a partir de lodos procedentes de plantas de depuración de aguas residuales urbanas e industriales.
- Líquidos de pirólisis fraccionados obtenidos a partir de lodos procedentes de plantas de depuración de aguas residuales urbanas e industriales.

Los ensayos de inhibición de la luminiscencia en *Vibrio fischeri* y de germinación en semillas de *Lepidium sativum* fueron empleados para evaluar la ecotoxicidad. Los

resultados para ambos ensayos revelan un alto nivel de toxicidad producido principalmente por las mezclas de los grupos 2 y 3.

Para evaluar la mutagenicidad se empleó el ensayo de *Salmonella*/microsoma. El protocolo fue seguido utilizando las cepas TA98, TA100, TA102 y TA104. Los resultados mostraron la presencia de actividad mutagénica producida por los componentes del grupo 3.

La evaluación genotóxica fue realizada mediante el ensayo de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster*. El protocolo fue seguido empleando los cruces estándar y alta bioactivación. Los resultados mostraron que los componentes del grupo 3 tienen la capacidad de producir daños genotóxicos.

Los cuatro métodos alternativos han demostrado ser rápidos, económicos y sensibles, por lo tanto estos han demostrado la existencia de riesgo ecotóxico, mutagénico y genotóxico producido por mezclas complejas empleadas en agricultura y en la valorización energética.

1. Introducción

Los seres humanos y otros organismos presentes en el medio ambiente rara vez estamos expuestos a sustancias químicas individuales. Por lo general, las exposiciones se producen de forma simultánea o secuencial a un gran número de sustancias que ejercen su acción a través de una variedad de rutas. Estas sustancias se encuentran agrupadas y dependiendo de su composición cuantitativa y cualitativa se denominan, mezclas simples y mezclas complejas (National Research Council y col., 1988; Groten y col., 2001; Feron y Groten, 2002).

Una mezcla simple es aquella que está conformada por diez o menos productos químicos cuya composición es cualitativa y cuantitativamente conocida. Ejemplos de ellas son: un cóctel de pesticidas, un grupo de ésteres de alcohol alílico o una combinación de medicamentos (Feron y col., 1998).

Una mezcla compleja está conformada por decenas, cientos o miles de sustancias químicas, cuya composición es cualitativamente y cuantitativamente desconocida (Feron y col., 1998). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (*Environmental Protection Agency*, EPA), señala que la composición química de una mezcla compleja puede ser inestable, debido a variaciones de sus componentes con el tiempo y con las condiciones en que estos se producen (U.S. EPA, 2000). Ejemplos de ello son los humos de cigarrillo, de soldadura u otros en cuyos procesos se forman nuevos hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), radicales libres, ácidos grasos insaturados y una variedad de productos intermedios.

El efecto biológico de la galaxia de compuestos que conforman las mezclas complejas es prácticamente imposible de predecir a partir del conocimiento de los constituyentes individuales, no sólo debido a su gran número, sino también porque los productos químicos transitorios generados podrían disiparse o cambiar con el tiempo y la temperatura (Dube y Green, 1982).

Las mezclas podrían formarse o tener como destino final el agua, el aire, los suelos, más tarde podrían incorporarse en los alimentos, ya sea como resultado de derrames accidentales o durante el ciclo de vida normal de las diferentes sustancias químicas.

En diciembre del 2003, el fondo mundial para la naturaleza (*World Wildlife Found*, WWF) lanzó una campaña para crear conciencia sobre la exposición continua de los ciudadanos

Introducción

Europeos a mezclas conformadas por compuestos persistentes, bioacumulativos y tóxicos. Analizaron 101 compuestos, incluyendo plaguicidas organoclorados, bifenilos policlorados (BPCs), difenil éter polibromados (DEPB), ftalatos y compuestos perfluorados. Con este estudio demostraron que las personas estaban contaminadas por un conjunto de productos químicos peligrosos. Estos hallazgos fueron motivo de preocupación, por lo que la Comisión de la Comunidad Europea indicó que se deberían crear estrategias adecuadas para la proteger la salud (Commission of European Communities, 2003).

Houlihan y col. (2005) revelaron que las mujeres del Reino Unido en promedio están expuestas a 515 productos químicos al día. En un estudio de biomonitorización de la sangre del cordón umbilical de recién nacidos, demostraron que se encuentran en promedio 200 sustancias antropogénicas, incluyendo plaguicidas, dioxinas, sustancias químicas industriales y compuestos fluorados.

Durante el 2008 y 2009, Tønning y col. (2009) investigaron la exposición de niños daneses de 2 años a productos químicos que habían demostrado producir disrupción endocrina en animales de laboratorio. Basándose en el análisis químico de los productos que consumían los niños, datos bibliográficos de los niveles de contaminantes que tenían dichos productos y medidas de contaminación aérea, determinaron que los niños estaban expuestos a elevados niveles de sustancias anti-androgénicas como son, ftalatos, fungicidas, herbicidas, BPC, dioxinas, dicloro difenil tricloroetano (DDT) y dicloro difenil dicloroetano (DDD) y compuestos estrogénicos como los parabenos y el bisfenol A. Como consecuencia inmediata de esta investigación el Ministerio de Medio Ambiente de Dinamarca puso en marcha un programa de consejos simples relacionados con la exposición de los niños a las mezclas químicas.

No sólo los humanos, sino también los organismos en el medio ambiente están expuestos a las mezclas de diversos productos químicos. Un estudio realizado por la Universidad de Ciencias Agrarias de Suecia, demostró que existen al menos 57 plaguicidas en diferentes arroyos de Suecia (Adielsson y col., 2006). Asimismo, el Servicio Geológico de EE.UU. reportó que un tercio de 139 ríos contienen 10 o más productos químicos diferentes, tales como, hormonas sintéticas, productos farmacéuticos, químicos industriales, plaguicidas, biocidas, entre otros (Kolpin y col., 2002).

La evaluación de los efectos tóxicos y la cuantificación de riesgos asociados a la exposición de mezclas químicas, es un desafío importante para los científicos, evaluadores y entidades reguladoras (Spurgeon y col., 2010; Feron y Groten 2002). Esto principalmente se debe a la complejidad para comprender los efectos potenciales que pueden producir estas mezclas. Además la presencia de algunos componentes podría enmascarar, diluir o aumentar la toxicidad de otros componentes a través de diversas interacciones como sinergismo o antagonismo (National Research Council, 1988; Schwarzenbach y col., 2006; Teuschler, 2007).

Aunque está clara la importancia de la evaluación de mezclas químicas, Yang (1994); Feron y Groten (2002), demostraron que el 95% de los estudios toxicológicos están dedicados a la investigación de productos químicos individuales. Esto puede deberse a que las propiedades físico-químicas de sustancias simples están mejor definidas, las dosis pueden ser fácilmente controladas, generalmente el destino biológico podría ser controlado de una manera directa, la concentración en el aire, el agua y el tejido podrían ser medidos con precisión y los datos pertinentes a menudo están disponibles en bibliografía de exposición ocupacional.

Sin embargo, diversos estudios (Kortenkamp y col., 2007 y 2009; Altenburger y Greco, 2009; Backhaus y col., 2008; Hass y col., 2007; Rajapakse y col., 2002; Silva y col., 2002; Walter y col., 2002; Faust y col., 2001) demostraron que no es lo mismo evaluar por separado los componentes de una mezcla, que la mezcla en su conjunto. Un ejemplo gráfico de esta aseveración se presenta en la figura 1.1, tomada del trabajo de Walter y col. (2002).

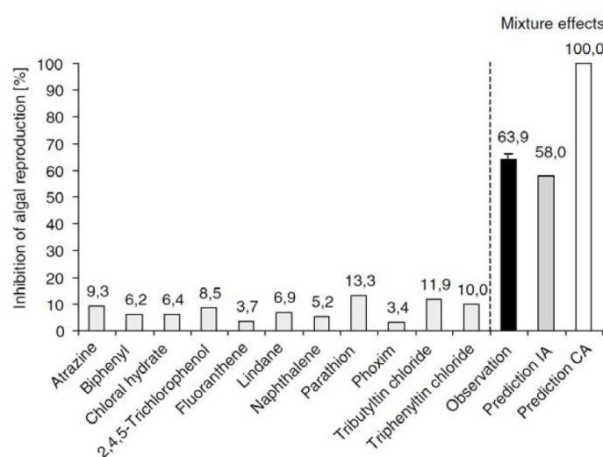


Figura 1.1 Comparación entre el efecto de compuestos simples y mezclas sobre la reproducción de algas.

Como se había mencionado anteriormente existe una amplia variedad de mezclas complejas que están presentes en el medio ambiente. En esta tesis se va a detallar el origen, composición, problemática actual y destino de los lodos de depuradora.

Introducción

1.2 Lodos de depuradora

1.2.1 Origen

En las estaciones de depuración de aguas residuales se llevan a cabo diferentes procesos, mecánicos, biológicos y físico-químicos, con el objetivo de regenerar y purificar el agua residual para que posteriormente sea reutilizada. Durante estos procesos se generan una serie de residuos como grasas, arenas y lodos. Los lodos de depuradora son el producto residual de mayor volumen que se producen en las estaciones de depuración (Harrington, 1978; Jolibois y Guebert, 2005; Fernández, 2007).

1.2.2 Composición

Los lodos de depuradora son considerados mezclas complejas ambientales, su composición es variable, normalmente están constituidos por sustancias químicas que componen el efluente (la mayoría responsables de las características nocivas del agua residual) (Tenenbaum, 1997; Comisión Científica Europea, 2001; Valverde y Pérez, 2001; Aguayo, 2003; Darvodelsky y Fien, 2005).

El Ministerio español de Medioambiente, Medio Rural y Marino (MARM, 2009), realizó un trabajo de caracterización de lodos de depuradora generados en España. Concluyeron que principalmente están conformados por compuestos nitrogenados, elementos como el P, Ca, Mg, K y Fe, “metales pesados”¹ como el Cd, Cr, Ni, Hg, Pb, Zn y Cu, masa bacteriana, compuestos orgánicos halogenados, alquibenceno sulfonatos lineales, ftalatos, nonifenoles, HPAs, BPC, dioxinas, furanos, PBDE, entre otros.

1.2.3 Problemática Actual

En la actualidad, la gestión de los residuos orgánicos urbanos se ha convertido en una de las prioridades dentro de las iniciativas destinadas a la protección del medioambiente y de la salud humana. Cada día se producen cantidades ingentes de residuos, de los cuales un porcentaje alto corresponde a los denominados lodos de depuradoras. La problemática de estos residuos se debe a los elevados volúmenes de producción que se generan, sin olvidar las consecuencias medioambientales y sanitarias que conlleva su inadecuada gestión. Además una vez extraídos de la planta de depuración, los lodos deben someterse a diferentes tratamientos de estabilización que permitan descomponer

¹ Según Repetto (2008), los auténticos “metales pesados” son aquellos cuyo peso atómico está comprendido entre el del Cu y el Hg. Sin embargo diferentes documentos relacionados con normativas ambientales incluyen como “metales pesados”, a elementos químicos que no lo son, tales como el Cr, Mn, Ni. Durante la lectura de esta tesis se sugiere que se tome en cuenta dicha aclaración, ya que el empleo de la expresión “metales pesados”, será aplicado en el contexto que se define en las normativas legales.

la materia orgánica, así como a operaciones de espesamiento, acondicionamiento y deshidratación para facilitar su manejo, transporte y almacenamiento (Fernández, 2007).

La tendencia clara en los próximos años es hacia un aumento de la producción de los lodos de depuradoras, debido principalmente al crecimiento en la construcción de estaciones de depuración como lo exigen la Directiva Comunitaria (91/271/CEE) relativa a las aguas residuales urbanas y el Plan Nacional de Saneamiento y Depuración de las aguas (Fernández, 2007)

En el caso de España, según el Consejo de la Comunidad Europea (1997), se encuentra entre los cinco principales países que genera mayor volumen de lodos. El Perfil Ambiental de España (2009), elaborado por el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (MARM) indica que anualmente el conjunto de depuradoras españolas produce más de un millón de toneladas de materia seca de lodos (Figura 1.2), siendo las Comunidades Autónomas de Madrid, Andalucía, Cataluña y la Comunidad Valenciana las que generan mayor volumen (Tabla 1.1).

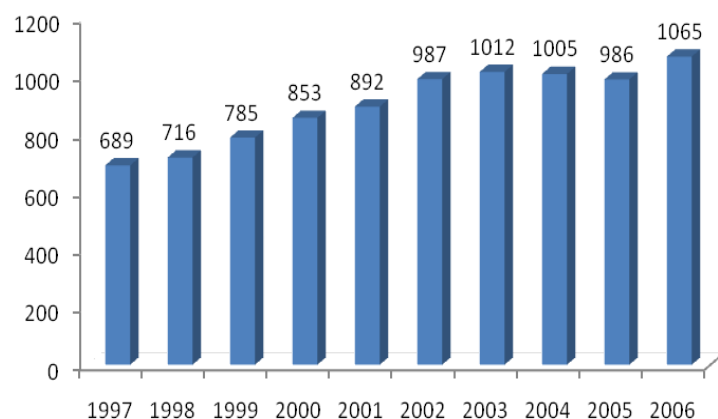


Figura 1.2. Producción de lodos (miles de toneladas materia seca/año).

Fuente: MARM

Tabla 1.1. Volumen de lodos de depuradora generados por las Comunidades Autónomas de España

Comunidad Autónoma	ton materia seca/año
Andalucía	312.500
Aragón	41.000
Asturias	36.000
Canarias	54.000
Cantabria	18.000
Castilla y León	81.000
Castilla-La Mancha	56.000
Cataluña	200.000
Ceuta	1.200
Comunidad Valenciana	130.000
Extremadura	36.000
Galicia	90.000
Illes Balears	29.000
La Rioja	8.000
Madrid	342.862
Melilla	1.100
Murcia	37.000
Navarra	11.314
País Vasco	63.000
Total España	1.547.976

Fuente: PNLD-EDAR

Introducción

1.2.4 Destino

La calidad final de los lodos va a definir la ruta a cual van a ser destinados estos residuos. La aplicación de tecnologías específicas de depuración para cada caso, además de una buena gestión de las plantas depuradoras y del control de los vertidos industriales, va a contribuir a la obtención de un material orgánico de mayor calidad y con riesgos menores para el medioambiente (Fernández, 2007).

La tabla 1.2, muestra un resumen presentado por el Perfil Ambiental de España (2009) de los principales destinos de los lodos entre 1997 y 2006.

Tabla 1.2 Destino de los lodos de depuración de aguas residuales (1000 t de materia seca)

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Uso agrícola	332,0	354,0	413,7	454,3	606,1	658,5	669,6	662,0	628,6	687,0
Vertedero	131,6	143,6	150,9	153,1	131,0	160,5	162,8	156,5	163,9	168,1
Incineración	20,0	33,5	33,5	70,2	54,8	68,9	76,8	39,2	39,7	41,1
Otros Usos	205,2	185,0	186,7	176,0	100,4	99,4	103,0	147,6	154,0	168,8
Total	688,8	716,2	784,9	853,5	892,2	987,2	1.012,2	1.005,3	986,1	1.065,0

En la actualidad, el Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales 2001-2006 y el Plan Nacional Integrado de residuos 2008-2015, indican que se debe aplicar el principio de jerarquía para la gestión de lodos de depuradora. Es decir: en primer lugar priorizar la aplicación en el suelo, en segundo lugar emplear otras formas de valorización incluyendo la energética y como última opción, la eliminación en vertedero (MARM, 2009).

1.2.4.1 Aplicación en el suelo

Los lodos por sus características son un recurso importante de materia orgánica y de elementos fertilizantes, lo que les hace ser una fuente potencial de nutrientes para su utilización agrícola. Aproximadamente el 50% de su peso en seco, corresponde a materia orgánica que contiene cantidades variables de nitrógeno (1-7%), fósforo (1-5%), potasio (0.3-3%) y micronutrientes con distinto grado de disponibilidad para las plantas (Soler y col., 1997; Tenenbaum, 1997; Fernández, 2007).

Sin embargo para su aplicación agrícola es necesario que los lodos sean pos-tratados, para de esta forma mejorar sus propiedades y garantizar condiciones higiénico-sanitarias óptimas. Los procesos tecnológicos de pos-tratamiento son múltiples y variados, pero se pueden destacar fundamentalmente dos: el compostaje y el secado térmico (Fernández, 2007).

1.2.4.2 Compostaje

Es un proceso biooxidativo controlado, en el que intervienen variados microorganismos, implica el paso por una etapa termófila, dando al final como productos de los procesos de degradación: agua, dióxido de carbono y una materia orgánica estabilizada y dispuesta para ser aplicada en la agricultura (Senesi, 1989; Fernández, 2007). Los lodos que son sometidos a este proceso se denominan lodos compostados.

1.2.4.3 Secado térmico

Consiste en la eliminación del agua que contienen estos residuos transmisión de calor por medio de un fluido térmico (aire, vapor o aceite). Gracias a este pos-tratamiento se consigue un porcentaje muy alto de materia seca, del orden del 90% (que supera el 65% obtenido mediante compostaje). Además las altas temperaturas a las que son sometidos los lodos aseguran la eliminación o inactivación de los microorganismos patógenos que inicialmente pudieran contener (Galdos, 2001). Los lodos sometidos a este tratamiento se denominan, lodos secados térmicamente.

La aplicación agrícola de los lodos de depuradora puede alterar las propiedades físico-químicas del suelo, producir cambios en el pH y la conductividad eléctrica (Nogales, 1994, Polo 1996 y 1991, Hernández y col., 1992, Allue y col., 1994, Soler, 1998), pero la principal problemática que reflejan las normativas es la concentración de “metales pesados”, los cuales podrían ser transferidos al ser humano a través de plantas, animales, o lixiviados (Iguanzo, 2004). El enriquecimiento en metales de los suelos en los que se esparzan los lodos y otras alteraciones están controlados legalmente por la Directiva 86/278/CEE, traspuesta a ordenamiento jurídico español mediante el Real Decreto 1310/1990 (Tabla 1.3).

Introducción

Tabla 1.3 Concentración máxima en metales pesados permitida por la normativa española (Real Decreto 1310/1990) para el aprovechamiento de lodos de depuradora como fertilizantes agrícolas.

Parámetro	Valores límite de concentración de metales en suelos (mg/Kg materia seca)		Valores límite de concentración de metales en los lodos (mg/Kg materia seca)	
	Suelos pH < 7	Suelos pH > 7	Suelos pH < 7	Suelos pH > 7
Cádmio	1	3.0	20	40
Cobre	50	210.0	1000	1750
Níquel	30	112.0	300	400
Plomo	50	300.0	750	1200
Zinc	150	450.0	2500	4000
Mercurio	1	1.5	16	25
Cromo	100	150.0	1000	1500

1.2.4.4 Valorización energética

Otro de los destinos de los lodos de depuradora es la valorización. Esta vía está ganando aceptación en la industria junto con otras tecnologías avanzadas. La valorización se puede llevar a cabo mediante procesos de combustión, gasificación y pirólisis. El objetivo de estos procesos es la obtención de productos con propiedades energéticas.

Específicamente la pirólisis, consiste en la descomposición térmica de la materia orgánica en ausencia de oxígeno, generándose cantidades variables de: gases, líquidos (alquitranes y aceites), residuos secos de carbón y agua, “metales pesados”, cenizas y otros tóxicos. El rango de temperaturas a los que se lleva a cabo la pirólisis, oscila entre 150°C y 900°C. Estos procesos buscan la eficiencia energética mediante la generación de compuestos químicos secundarios y calor (Chiang, 1997; Piskorz, 1986; Fullana, 2001; Azuara y col., 2008). En la tabla 1.4. Se presentan algunos subproductos que se obtienen de la pirólisis de materias orgánicas.

Tabla 1.4. Subproductos que se obtienen durante el proceso de pirólisis

Fracción líquida	Fracción Gaseosa	Fracción Sólida
Metanol, Etanol Fenol Acetona Acetaldehído Ácido fórmico metilfurfural, otros.	Hidrogeno Nitrógeno, oxígeno Metano, amoníaco Etano, oxígeno, CO ₂ , CO Hidrocarburos C ₄ -C ₇ , otros	Carbón Sales Metales Cenizas

1.3 Consideración de las mezclas en la legislación europea

En el 2010 la Comisión Europea (CE) publicó la investigación de Kortenkamp y col. (2009) titulado “Estado del arte en la toxicología de mezclas”, donde se indica que existen 21 aspectos legislativos, entre Directivas y Reglamentos Europeos asociados con la toxicidad de mezclas, tal como se muestra en la tabla 1.5. Se remarcan en color aquellos que involucran directa o indirectamente las mezclas que se evalúan en esta investigación.

Tabla 1. 5. Legislación de la U.E. relacionada con mezclas químicas

1	Aditivos alimentarios autorizados para consumo humano. Directiva 89/107/CEE.
2	Materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos. Reglamento (CE) N° 1935/2004
3	Aditivos en la alimentación animal. Reglamento (CE) N° 1831/2003
4	Preparación y presentación de solicitudes y a la evaluación y autorización de aditivos para piensos. Directiva 2001/79/CE y Reglamento (CE) N° 429/2008
5	Límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. Reglamento (CE) N° 396/2005
6	Alimentos e ingredientes alimentarios nuevos. Reglamento (CE) N° 258/97
7	Alimentos y piensos modificados genéticamente. Reglamento (CE) N° 1829/2003
8	Autorización de nuevos alimentos y piensos modificados genéticamente, cuya evaluación de riesgo haya sido favorable. Reglamento (CE) N° 641/2004
9	Relativa a la seguridad general de los productos. Directiva 2001/95/CE
10	Cosméticos. Directiva 76/768/CEE
11	Evaluación y control del riesgo de las sustancias existentes. Reglamento (CEE) N° 793/93
12	Clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. Directiva 67/548/CEE
13	Clasificación, el envasado y el etiquetado de preparados peligrosos. Directiva 1999/45/CE
14	REACH. Reglamento (CE) N° 1907/2006
15	Clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas. Reglamento (CE) N° 1272/2008
16	Comercialización de productos fitosanitarios. Directiva 91414/CEE
17	Comercialización de biocidas. Directiva 98/8/CE
18	Código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Directiva 2001/83/CE
19	Código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Directiva 2001/82/CE
20	Evaluación de las repercusiones de determinados proyectos públicos y privados sobre el medio ambiente. Directiva 85/337/CEE
21	Prevención y control integrados de la contaminación. Directiva 2008/1/CE

Introducción

La norma REACH (*Registration, Evaluation, and Authorization of Chemicals*) (CE, 2006), es la que centraliza los demás sistemas legales. Esta norma es un sistema integrado único de registro, evaluación y autorización de sustancias y preparados químicos. El término “preparado” involucra a combinaciones de sustancias que se comercializan, producen o importan. Por lo tanto el REACH no cita realmente el análisis de mezclas ambientales.

En el caso de los lodos de depuradora, al ser residuos, no estarían contemplados dentro de esta normativa, pero sí los productos que se valoricen a partir de estos. Por ejemplo, los líquidos de pirólisis.

Mezclas como los residuos orgánicos que se aplican en agricultura, son sometidas a diferentes normativas. En el caso de los lodos de depuradora se establecen directrices específicas (Tabla 1.6) con el objetivo de proteger los suelos y aguas, además de minimizar prácticas de eliminación por incineración y vertederos e incrementar la reutilización y el reciclado de estos residuos.

Tabla 1.6. Normativa aplicable a los lodos de depuradora

1	Plan Nacional de lodos.
2	Protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura. Directiva 86/278/CEE
3	Directiva marco de Residuos (91/156/CEE)
4	Vertido de residuos. Directiva (1999/31/CEE)
5	Protección de aguas contra la contaminación producida por nitratos de origen agrario. Directiva 91/676/CEE
6	Tratamiento de las aguas residuales urbanas. Directiva 91/271/CEE

Dependiendo de los objetivos y exigencias legales, las pruebas toxicológicas están involucradas en los diferentes reglamentos. En su mayoría, las pruebas implican metodologías de tipo analítico que consisten en determinar una serie de parámetros físico-químicos. Por otro lado se hallan las pruebas toxicológicas que emplean ensayos biológicos, principalmente se promueven aquellos que forman parte de los métodos alternativos a la experimentación animal.

1.4 Métodos alternativos a la experimentación animal

“En los últimos años se ha manifestado una creciente sensibilización social en las cuestiones vinculadas al medioambiente y a la protección y bienestar animal. El constante avance de la investigación en todos los ámbitos de las ciencias y de la tecnología ha puesto de relieve una mayor concienciación de la necesidad de extender la reflexión social sobre los problemas éticos relacionados con la utilización de los animales en la experimentación, tema que se reconoce, ha trascendido del círculo estricto de la comunidad científica para alcanzar un ámbito social más amplio. (Red Española de Métodos Alternativos).

Los métodos alternativos se definen como todos aquellos procedimientos que pudieran **reemplazar** a los experimentos realizados con animales, **reducir** el número de animales empleado en cada ensayo, o **refinar** protocolos ya existentes con el fin de disminuir el estrés y el sufrimiento infligido a animales. Estas orientaciones fueron descritas por Russell y Burch (1959) como las tres erres (3R).

Entre los procedimientos alternativos posibles están: el uso de seres vivos menos evolucionados como los invertebrados, bacterias, algas, hongos, protozoos y plantas que generalmente no están protegidos por la legislación clásica de experimentación animal.

Pruebas “*in vivo*” en invertebrados y la aplicación de métodos “*in vitro*”, pueden ser substitutivos de los ensayos con animales, o ser complementarios para mejorar la sensibilidad y especificidad de los estudios con animales. Por otro lado hay que tener presente que los procedimientos *in vitro* proporcionan una información más profunda sobre los mecanismos de acción tóxica que la obtenida *in vivo* (Eisenbrand y col., 2002; Repetto, 2008).

La Unión Europea mediante Directiva 2010/63/ UE del Parlamento Europeo y del Consejo 86/609/CEE juntamente con la REMA y la Plataforma Europea de Consenso en Alternativas (ECOPA) están trabajando en el desarrollo de sistemas de evaluación sencillos, rápidos, reproducibles y de elevada sensibilidad que no impliquen el empleo de vertebrados superiores (Rogiers, 2005). Además, el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), se ha convertido en el responsable de su regulación desde la aprobación del nuevo Reglamento REACH (Pérez, 2010)

Introducción

Los estudios que aplican métodos alternativos para la evaluación de sustancias químicas (Repetto y col., 2001; Jos y col., 2003 y 2005; Eguchi y col., 2004) están en continuo incremento, así como aquellos que se enfocan a la evaluación de toxicidad de mezclas (Cleuvers, 2003, 2004; Brain y col., 2004; DeLorenzo y Fleming, 2008).

En este sentido esta tesis doctoral enfoca su atención a los métodos alternativos relacionados con los estudios de ecotoxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad de mezclas.

1.5 Ecotoxicología

La ecotoxicología es una rama de la toxicología que estudia los efectos tóxicos de los agentes físicos y químicos sobre las poblaciones y comunidades de los ecosistemas; abarca las formas de transferencia de estos agentes y sus interacciones con el ambiente (Repetto M. y col., 2008).

Muchos de los problemas ambientales que actualmente conocemos están siendo considerados, evaluados e investigados por esta nueva ciencia. La ecotoxicología es una ciencia moderna que está contribuyendo de forma acelerada a aportar soluciones para proteger la salud humana y el medioambiente.

La metodología que se utiliza en ecotoxicología es de desarrollo reciente, progresando de forma acelerada gracias la ayuda de otras ciencias. La ecología ha constituido el marco en el que tienen lugar las respuestas de los receptores o seres vivos, que con el nivel de organización que ocupan en la red trófica, están expuestos a la agresión de los agentes tóxicos ambientales. Así, la valoración de efectos, base fundamental y principio de la ecotoxicología se desarrolla sobre cualquier organismo o nivel de organización, en el que se pueda observar una respuesta cualitativa o cuantitativa. Esta valoración de efectos se realiza con fines predictivos, que intentan anticiparse a una situación, o con fines de valoración, cuando la situación ha ocurrido (Muñoz y col., 2008).

Los procedimientos más habituales en ecotoxicología son los bioensayos, que se realizan con organismos generalmente de una única especie y en condiciones controladas de laboratorio. Con ellos se pretende obtener información acerca de los efectos producidos por una sustancia o mezcla compleja.

Los bioensayos en organismos acuáticos están más desarrollados que los que emplean organismos terrestres. La gran mayoría de los estudios se realizan sobre sustancias puras y compuestos (Salizzato y Pavoni, 1998), pero también están destinados a la vigilancia y control ambiental, como son: la valoración de vertidos industriales, lixiviados de residuos, suelos contaminados y otras mezclas complejas (Manuzadsianas y col., 2003; Fuentes y col., 2004).

Hay muchos bioensayos sobre los cuales existen protocolos muy bien definidos. Algunos de estos han sido estandarizados por entidades internacionales (OCDE, ASTM, CEE, UE, ISO, USEPA). Otros, aunque sus procedimientos no están estandarizados, disponen de una gran relevancia, pues su desarrollo puede ser más reciente que el estandarizado y ofrecer mayor información. En la tabla 1.7 se muestran los ensayos biológicos de mayor aplicación para estudios ecotoxicológicos, se destacan en color gris, los ensayos aplicados en esta tesis.

Tabla 1.7. Ensayos ecotoxicológicos más empleados

Ensayo	Organismo
Toxicidad aguda de inhibición de germinación de semillas	<i>Lactuca sativa</i> , <i>Lepidium sativum</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Shorgum bicolor</i>
Toxicidad aguda con bacterias (inhibición de luminiscencia)	<i>Vibrio fischeri</i> (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)
Toxicidad aguda de inhibición de crecimiento de raíz	<i>Allium cepa</i> L.
Toxicidad aguda con Cnidarios	<i>Hydra attenuata</i>
Toxicidad crónica con algas	<i>Selenastrum capricornutum</i> (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>), Microalgas clorofíceas, <i>Ankistrodesmus falcatus</i>
Toxicidad aguda con cladóceros	<i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia exilis</i> , <i>Daphnia pulex</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> o <i>Moina macrocopa</i>
Toxicidad aguda con larvas y peces juveniles	<i>Brachydanio rerio</i> , <i>Poecilia reticulata</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Oreochromis mosambicus</i> , <i>Ciprinus carpio</i> , <i>Cichlasoma urophthalmus</i> y <i>Cichlasoma synspilum</i>
Toxicidad aguda con peces	<i>Xiphophorus montezumae</i>
Toxicidad con nematodos	<i>Panagrellus redivivus</i>
Toxicidad aguda y crónica con anélidos	<i>Eisenia andrei</i> , <i>Eisenia foetida</i>

Los ensayos de inhibición en la germinación de semillas e inhibición de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*, son los más citados en la literatura científica de ensayos ecotóxicos.

Introducción

Mediante el ensayo de inhibición en la germinación de semillas se destacan estudios en los que se han evaluado: lixiviados (Pereira y col., 2009, Kristen 1997), suelos contaminados (Gong y col., 2001; Kristen 1997; Manzo y col., 2008), mezclas de HPAs (Mphekgo y col., 2002), aguas de ríos contaminados (Devesa-Rey y col., 2008; Kristen 1997), aguas residuales (Gouider y col., 2010; Arienzo y col., 2009; Kristen, 1997), “metales pesados” (Aramba y col., 1995) y partículas aéreas (Cape, 2003).

Entre las especies que más se emplean para determinar el índice de germinación se hallan: *Lactuca sativa*, *Lepidium sativum*, *Zea mays*, *Avena sativa*, *Brassica rapa*, *Phaseolus vulgaris* y *Hordeum vulgare*.

Se han realizado una variedad de estudios ecotoxicológicos de los lodos de depuradora, mediante el ensayo de germinación de semillas. Por ejemplo, Oleszczuk (2008a y b), Acosta y col. (2004) evaluaron lodos sin estabilizar, Wilke y col. (2008) estudiaron lodos secados térmicamente, Carbonell y col. (2009), Celis y col. (2006 y 2007) lodos estabilizados anaeróbicamente, lixiviados de lodos, suelos enmendados con lodos, Carbonell y col. (2009), Fuentes y col. (2004 y 2006), Miao Miao y col. (2009) metales pesados en lodos y Fang y Wong (1999), Margesin y col. (2006) lodos compostados. Las especies que se han empleado en estos trabajos fueron: *Lepidium sativum*, *Brassica rapa*, *Brassica chinensis*, *Lactuca sativa*, *Vicia faba*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*.

La utilización del ensayo de inhibición de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* ha demostrado ser sensible, rápida y rentable (Parvez y col., 2007). Diversos autores han realizado estudios evaluando una variedad de mezclas complejas, como son: lixiviados de vertederos (Devaré y Bahadir, 1994), contaminación de ríos (Bernardo y col., 2009; Guzella, 1998), suelos contaminados (Abbondanzi y col., 2003; Manzo y col., 2008; Eom y col., 2007; Bispo y col., 1999), aguas residuales (Fernández-Alba y col., 2001; Manusadzianas y col., 2003; Bayo y col., 2009; Monarca y col., 2000; Aguayo y col., 2003), “metales pesados” (Kungolos y col., 2009; Ren y Frymier, 2005), contaminantes orgánicos (Salizzato y col., 1998), potabilización de aguas (Zani y col., 2005), biocidas (Fernández-Alba y col., 2001), HPAs (El-Alawi y col., 2002, Olajire y col., 2005; Devesa-Rey y col., 2008) y otros residuos (Bernardo y col., 2010; Pandard y col., 2006).

Respecto a los lodos de depuradora, con el empleo del ensayo de *Vibrio fischeri* se han evaluado, lixiviados de lodos (Papadimitriou y col., 2008; Alveranga y col., 2008; Renoux

y col., 2001), lixiviados de suelos contaminados con metales remediados con lodos de depuradora (Pérez-Sirvent y col., 2007), lodos activados (Ren, 2004; Katsoyiannis y Samara, 2007; Christofi y col., 2001), lodos crudos (Farre y Barceló, 2003; Wilke y col., 2008), la toxicidad de lodos urbanos y lodos industriales (Mantis y col., 2005), metales pesados en suelos enmendados con lodos (Herwijnen y col., 2007), fármacos, hormonas y disruptores endócrinos presentes en lodos (Lündstrom y col., 2010), residuos sólidos que se obtienen de la pirólisis de lodos de depuradora (Lapa y col., 2007), lodos estabilizados por adición cenizas volantes y cal (Samaras y col., 2008) y lodos destinados a la enmienda de suelos (Herrero y col., 2005).

Otros ensayos de ecotoxicidad al que fueron sometidos los lodos de depuradora son: toxicidad en anélidos, *Eisenia fetida*, toxicidad en colémbolos, *Folsomia candida*, toxicidad en plantas acuáticas, *Lemna minor* (Wilke y col., 2008; Carbonell y col., 2009), toxicidad en microcrustaceos, *Daphnia magna* (Alvarenga y col., 2007; Papadimitriou y col., 2008; Fjälborj y col., 2005) y *Allium cepa* (Rank y Nielsen 1998).

1.6 Toxicología genética

La toxicología genética es la disciplina científica que ha sido desarrollada para cumplir funciones de identificación y análisis de aquellos agentes que a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados mediante mecanismos acción directa o indirecta (Castaneda y col., 1994). En ambos casos puede darse lugar a la producción de intermediarios reactivos, capaces de formar complejos con el ADN y ocasionar: muerte celular, mutación o transformación celular.

La aplicación de modelos biológicos en los que se utilizan organismos de variada complejidad, abarcando desde unicelulares simples, como las bacterias, hasta mamíferos y cultivos de células humanas, ha impulsado el rápido desarrollo de esta ciencia.

Muchos de estos modelos están incentivados por el nuevo Reglamento Europeo REACH y validados a nivel internacional por distintos organismos: ECVAM (Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos), OCDE (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico), NICEATM (Centro Interdepartamental del Programa Nacional de

Introducción

Toxicología para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos), REMA (Red Española de Métodos Alternativos), entre otros (Herrero, 2008).

Se conoce que están descritos más de 200 ensayos *in vitro* e *in vivo*, muchos de estos no han sido suficientemente validados, y otros no han demostrado ser tan eficaces como prometían en sus inicios (Brusik, 1987). La tabla 1.8 muestra la clasificación de los principales ensayos aplicados en la toxicología genética, capaces de detectar diferentes tipos de alteraciones genéticas como mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas estructurales o pérdida de cromosomas. Se destacan en gris y negrita, los ensayos que se emplearon en esta investigación.

Los ensayos genotoxicológicos son aplicados de manera que se obtengan datos acerca de la actividad de un compuesto o mezcla compleja, pero también alcanzan un punto en el que la evaluación además proporciona información de un probable riesgo mutagénico y posible riesgo carcinogénico.

El término mutagénico está destinado a aquellos agentes químicos, físicos o biológicos capaces de aumentar la frecuencia de mutaciones génicas o cromosómicas (de la Peña y col., 2001), mientras que el término genotóxico está destinado a los agentes mutagénicos o a aquellos que interaccionan directa o indirectamente con el ADN, pero cuya actividad mutagénica no ha sido demostrada (Adler y col., 1989).

1.6.1 Mutagenicidad en bacterias

Se entiende por mutagénesis aquella modificación del material genético que resulta estable y transmisible a las células hijas que surgen del proceso de división celular. En el caso de que el ADN afectado corresponda a células de la línea germinal se producirán mutaciones que son potencialmente transmisibles a la descendencia y, por lo tanto, hereditarias, mientras que si se trata de células somáticas solo afectarán a las características específicas de esas células, y únicamente se transmitirán a otras células hijas del mismo individuo (Bello y López, 2001).

Entre los distintos ensayos, los ensayos de mutación reversa con bacterias son muy utilizados para la evaluación mutagénica de las sustancias químicas, especialmente para hacer un primer análisis de sus propiedades genotóxicas.

Tabla 1.8. Clasificación de los principales ensayos de la toxicología genética (Osaba, 1995).

ENSAYO	ORGANISMO
Para detección de mutación génica	
Ensayos en bacterias	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
Ensayos en hongos y levaduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosacharomyces pombe</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Neurospora crassa</i>
Ensayos en plantas	<i>Arabidopsis</i> , <i>hordeum</i> , <i>Tradescantia</i>
Ensayos de mutación somática	<i>Drosophila melanogaster</i>
Ensayo de letales recesivos ligados al sexo	<i>Drosophila melanogaster</i>
Ensayos en células de mamífero <i>in vitro</i>	Fibroblastos de hámster chino (V79), células de ovario de hámster chino (CHO), células de linfoma de ratón (L5178Y), linfoblastos humanos
Ensayo de la mancha	Ratón
Ensayo de locus específico	Ratón
Para detección de mutaciones cromosómicas (numéricas o estructurales)	
Ensayos de aneuploidía	<i>S. cerevisiae</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>N. crassa</i> , <i>D. melanogaster</i>
Ensayos de aberraciones cromosómicas en plantas	<i>Allium cepa</i> , <i>Hordeum</i> , <i>Trasdescantia</i> , <i>Vicia faba</i> .
Ensayos de aberraciones estructurales y numéricas <i>in vitro</i>	Cel. de hámster chino, cel. de hámster sirio, cel. de ratón, cel. de rata., cel. animales y humanas transformadas, fibroblastos o linfocitos humanos
Ensayos de aberraciones estructurales y numéricas <i>in vivo</i>	<i>D. melanogaster</i> , cel. de médula ósea de roedor o humanos, linfocitos humanos
Ensayo de traslocación heredable	<i>D. melanogaster</i> , ratón
Ensayo de letalidad dominante	<i>D. melanogaster</i> , ratón, rata
Ensayo de micronúcleos	Plantas, cel. Animales <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i> , cel. humanas <i>in vitro</i> o <i>in vivo</i>
Para detección de daño primario al ADN	

Introducción

Ensayos que detectan roturas en el *E. coli*, *S. cerevisiae*

ADN

Ensayos de toxicidad diferencial en *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*
cepas deficientes en reparación

Ensayos de inducción de *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. nidulans*, *D. melanogaster*
recombinación mitótica

Ensayos de intercambio entre *Vicia faba*, cel. animales *in vitro* o *in vivo*, fibroblastos humanos *in vitro*
cromátidas hermanas

Linfocitos humanos *in vitro* o *in vivo*, cel. humanas transformadas

Por su sencillez y rapidez, los ensayos bacterianos son de los más utilizados a la hora de evaluar productos, ya que permiten identificar sustancias capaces de causar, fundamentalmente, sustituciones de bases o adiciones y deleciones. Las especies más utilizadas para este tipo de ensayos son *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*.

A finales de los ochenta y principios de los noventa, se realizaron numerosos estudios para comparar los resultados de mutagenicidad y carcinogenicidad de diversos compuestos químicos, con objeto de establecer el valor predictivo de los ensayos de mutagenicidad sobre el potencial cancerígeno de un compuesto. Debido a la escasez de datos en el ser humano, generalmente se utilizaron datos de carcinogénesis en animales. Las conclusiones a las que llegaron en cuanto al porcentaje de carcinógenos positivos detectados por un ensayo de mutagenicidad, como es el caso del ensayo de *Salmonella typhimurium*, demostraron ser variables en función del tipo de compuestos evaluados y de los criterios adoptados para considerar el compuesto como carcinógeno en animales. Los porcentajes encontrados oscilan entre un 56 y un 93% (Bello y López, 2001; Ames y col., 1973).

En resumen, las relaciones entre mutación, alertas estructurales y cáncer indican que una respuesta mutagénica reproducible es un indicador claro de que el compuesto tiene propiedades mutagénicas. Por consiguiente, puede ser también un compuesto carcinogénico y la actitud más prudente sería profundizar en el estudio biológico para la obtención de más datos, que permitan una correcta evaluación del riesgo tóxico que conlleva la exposición del ser humano a dicho agente bajo unas determinadas condiciones (Bello y López, 2001)

Algunos compuestos químicos son intrínsecamente reactivos, es decir, pueden formar aductos con el ADN directamente, se tratan de compuestos electrofílicos en mayor o menor medida, que reaccionan con los centros nucleofílicos presentes en el ADN, como pueden ser los epóxidos, N-óxidos aromáticos, alquilnitrosoureas, a estos se les considera compuestos genotóxicos directos. Sin embargo, otros compuestos, necesitan de una activación metabólica antes de ser genéticamente activos. Son los compuestos genotóxicos indirectos, que por sí mismos carecen de carácter electrofílico, pero que se convierten en metabolitos electrófilos por la acción de algunos sistemas enzimáticos presentes en las células de mamífero, fundamentalmente las oxigenasas de función mixta o sistema citocromo P450, localizado en el retículo endoplásmico liso de las células hepáticas principalmente, aunque también en otros tejidos. Esta actividad celular, cuyo objetivo principal es facilitar la eliminación de xenobióticos, da lugar en ocasiones a la aparición de moléculas electrofílicas y reactivas con el ADN (Bello y López, 2001.)

El problema de los ensayos de mutagenicidad en bacterias es, que se requiere de un sistema exógeno de activación metabólica, con el fin de reproducir al máximo las condiciones de biotransformación a las que un compuesto químico se expone dentro de un organismo vivo. Las preparaciones enzimáticas se obtienen a partir de tejidos ricos en este sistema enzimático, como por ejemplo el hígado.

Actualmente el ensayo de mutagénesis en *Salmonella typhimurium* es considerado como uno de los más populares y ampliamente utilizado a nivel mundial. Se pueden destacar estudios en los que se han evaluado mezclas complejas como son: lixiviados, suelos enmendados con residuos orgánicos (Brown y col., 1986;), suelos contaminados (Plewa y Hopke, 1984; White y Claxton, 2004), HPAs (Eiden y col., 2002), aguas de ríos contaminados (Ohe y col., 2003), aguas residuales (Aguayo y col., 2004; Carballo y col., 2002, Claxton y col., 1998; Jolibois y Guerbert, 2005, Jolibois y col., 2003), metales pesados, partículas aéreas, aguas para consumo (Albaladejo y col., 1995), componentes orgánicos en aguas residuales (Stahl, 1991), mezclas volátiles (Pancorbo y col., 1989; Araki y col., 1994; Bridges, 1978; Barber y col., 1981; Bünger y col., 2000 y 2007; Nakajima y col.; 2006;) y partículas aéreas (Amador-Muñoz y col., 2001)

Entre los estudios *Salmonella*/microsoma que se realizaron para evaluar la mutagenicidad de lodos de depuradora se destacan: Rank y Nielsen (1998), Klee y col.

Introducción

(2004), Babish y col. (1983), Mumma y col. (1988), Mathur y col. (2007) quienes evaluaron lodos crudos sin estabilizar, Blevins y Brennan (1990) estudiaron lodos activados, Boyd y col. (1982) investigaron los efectos de vegetales cultivados en suelos enmendados con lodos de depuradora, lodos secados térmicamente, lodos estabilizados anaeróbicamente, lixiviados de lodos, Herrero y col. (2005) suelos enmendados con lodos, de la Peña y Herrero (2005) metales pesados en lodos y lodos compostados.

También se encuentran estudios de teratogenicidad y embriotoxicidad por exposición a lodos procedentes de industrias textiles (Soni y col., 2008) y lixiviados de lodos (Blevins y Brennan, 1990).

1.6.2 Genotoxicidad

El objetivo de los ensayos de genotoxicidad es evaluar el riesgo genotóxico de un agente o de una exposición determinada.

Para tratar de identificar la gran variedad de agentes genotóxicos, se han diseñado distintos ensayos que utilizan diferentes sistemas biológicos de complejidad variable, abarcando desde bacterias hasta mamíferos y cultivos de células humanas. En la actualidad hay tres factores importantes a tomar en cuenta a la hora de realizar un ensayo de genotoxicidad:

Primero, es indiscutible la importancia de utilizar un ensayo que sea compatible con los métodos alternativos a la experimentación animal. Los mamíferos presentan muchos inconvenientes para ser usados de manera generalizada, su ciclo reproductor es largo, la descendencia es cuantitativamente baja, tienen un alto costo de mantenimiento, ocupan gran espacio y actualmente existen directrices legales que restringen el empleo de estos organismos.

Segundo, es importante la promoción de métodos alternativos *in vivo*, ya que el proceso de metabolización resulta difícil reproducirlo *in vitro*, especialmente de aquellos compuestos a la que la exposición humana sea elevada (Tweats, 1988).

Tercero, en la actualidad se conoce que además de aplicar ensayos que diagnostiquen agentes genotóxicos capaces de inducir mutaciones génicas y cromosómicas, es importante impulsar ensayos de detecten otro parámetro: la recombinación mitótica. De

hecho, actualmente se sabe que la recombinación contribuye de manera significativa al origen de: dolencias coronarias, diabetes, envejecimiento en general y principalmente el cáncer. Por ello la genotoxicología está centrando sus investigaciones en agentes que inducen recombinación en células somáticas (Rodríguez y col., 2010).

Uno de los organismos que ha sido ampliamente utilizado como material de experimentación en los estudios de genotoxicidad es la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Rizki, 2005).

La inclusión de *Drosophila* en las baterías de ensayo viene determinada por sus múltiples ventajas para este tipo de estudios, como son:

- a) Posee un tiempo de generación corto y es fácil de reproducir (9-10 días), por lo que entre los organismos eucariotas complejos, es el que permite realizar ensayos de genotoxicidad con mayor rapidez (Auerbach y Robson, 1947). Además su mantenimiento es fácil y de bajo coste económico.
- b) Es un organismo genéticamente muy bien estudiado, del cual se conocen muchas mutaciones con efecto visible, que pueden usarse como marcadores genéticos. También se conocen muchas reordenaciones cromosómicas, especialmente inversiones, de gran utilidad en los estudios de mutagénesis. Además existe una amplia variedad de cepas deficientes en los mecanismos de reparación que pueden emplearse para aumentar la sensibilidad de los ensayos de mutagenicidad (Graf y col., 1979; Zimmering, 1982; Fujikawa y Kondo, 1986).
- c) Es capaz de activar promutágenos, tanto en los tejidos somáticos como en los germinales, de forma similar a lo que ocurre en los mamíferos (Vogel y Sobels, 1976).
- d) Tiene un sistema de activación-detoxificación que en muchos aspectos es muy parecido al de los mamíferos (Hällström y Grafström, 1981), lo cual permite hacer extrapolaciones más fiables de los resultados.
- e) Es un organismo eucariota con reproducción sexual que presenta unos estadios germinales paralelos a los de mamíferos y resulta sencillo analizar la sensibilidad diferencial de los distintos estadios frente a la actividad mutagénica de un determinado agente (Valencia, 1983).

Introducción

- f) Posee pocos cromosomas (4 pares), y muchos de los *loci* génicos conocidos y de interés para ser utilizados en investigación están en el cromosoma X y en los dos autosomas mayores. Esto permite medir con relativa facilidad las frecuencias de las alteraciones en los distintos cromosomas.
- g) Además los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de las larvas permiten detectar fácilmente el tipo de reordenación cromosómica.

Gracias a ese conjunto de ventajas que posee *Drosophila melanogaster*, se han diseñado ensayos de corta duración para identificar diversos agentes mutagénicos y carcinogénicos.

Uno de los ensayos que se ha ido desarrollando para la detección rápida, económica, *in vivo* de agentes genotóxicos es el ensayo de mutación y recombinación somática. La importancia de este ensayo es su capacidad de detectar y cuantificar mutación y recombinación somática, por esta razón se le ha denominado SMART (*Somatic Mutation And Recombination Test*).

Actualmente se dispone de dos sistemas de ensayo SMART, uno que emplea marcadores de alas (Graf y col., 1983; Szabad y col., 1983) y otro que afecta a la pigmentación del ojo (Vogel y Zijlstra 1987).

Mediante el ensayo SMART se han realizado una serie de evaluaciones, desde compuestos químicos puros (Fragiorgio y col., 2008) hasta mezclas complejas, como: ríos contaminados (Jacociunas y col., 2010; do Amaral y col., 2005 y 2006; Sartini y col., 2008; de Moraes y col., 2007), aguas residuales, metales (Carmona y col., 2008; Yesilada, 2001; Osaba y col., 2002; Iyehara y col., 1994), contaminantes orgánicos, potabilización de aguas, herbicidas (Kaya y col., 2000 y 2004; Torres y col., 1992), fungicidas (Rahden-Staron, 2002), plaguicidas (Osaba y col., 1999; Pillco, 2006), extractos de plantas (Pillco y Rodrigo, 2005, Mamani y col., 2006), HPAs (Whysner y col., 2004; Müller, 2002; Delgado-Rodriguez y col., 1995; Frölich y Würigler, 1994; Dean, 1985; Dehl y col., 2008), alimentos (Kounatidis y col., 2009) y pruebas de antigenotoxicidad (Karekar y col., 2000).

2. Objetivos

Esta tesis se enmarca dentro de la línea de investigación desarrollada en el Laboratorio de Mutagénesis Ambiental del Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Grupo de Toxicología Celular del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, sobre “Desarrollo y optimización de una estrategia de ensayos para la evaluación toxicológica de mezclas contaminantes ambientales”

En este contexto, el objetivo de este trabajo se centró en la estrategia de realizar evaluaciones toxicológicas de mezclas complejas que son potencialmente destinadas a la agricultura como enmiendas orgánicas o como materia prima con alto valor energético, mediante métodos alternativos a la experimentación animal de ecotoxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad.

Por ello se persiguen los siguientes objetivos parciales:

- Evaluar los efectos fitotóxicos de mezclas complejas utilizando el ensayo de germinación en semillas de *Lepidium sativum*.
- Evaluar los efectos ecotóxicos de mezclas complejas utilizando el ensayo de toxicidad aguda de *Vibrio fischeri*.
- Evaluar los efectos mutagénicos de mezclas complejas utilizando el ensayo *in vitro* de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*.
- Evaluar los efectos genotóxicos de mezclas complejas utilizando el ensayo *in vivo* de mutación y recombinación somáticas (SMART) en alas de *D. melanogaster*.

3. Material y métodos

3.1 Selección de las mezclas

Las mezclas seleccionadas para la evaluación ecotóxica, mutagénica y genotóxica fueron divididas en tres grupos:

Grupo 1. Mezclas complejas relacionadas con la agricultura:

- Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora
- Suelos agrícolas enmendados con: lodo de depuradora, lodo compostado y compost de residuos sólidos urbanos.
- Enmiendas agrícolas: lodos de depuradora, lodo compostado y compost de residuos sólidos urbanos (RSU).

Grupo 2. Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético:

- Lodo procedente de una planta de depuración de aguas residuales urbanas.
- Lodo procedente de una planta de depuración de aguas residuales industriales.

Grupo 3. Mezclas complejas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora:

- Líquidos de pirólisis sin fraccionar, obtenidos a partir de lodos procedentes de plantas de depuración de aguas residuales urbanas e industriales.
- Líquidos de pirólisis fraccionados obtenidos a partir de lodos procedentes de plantas de depuración de aguas residuales urbanas e industriales.

La figura 3.1 muestra gráficamente las diferentes mezclas seleccionadas. En naranja se presentan las mezclas del grupo 1, en marrón las que pertenecen al grupo 2 y en azul las correspondientes al grupo 3.

Material y métodos

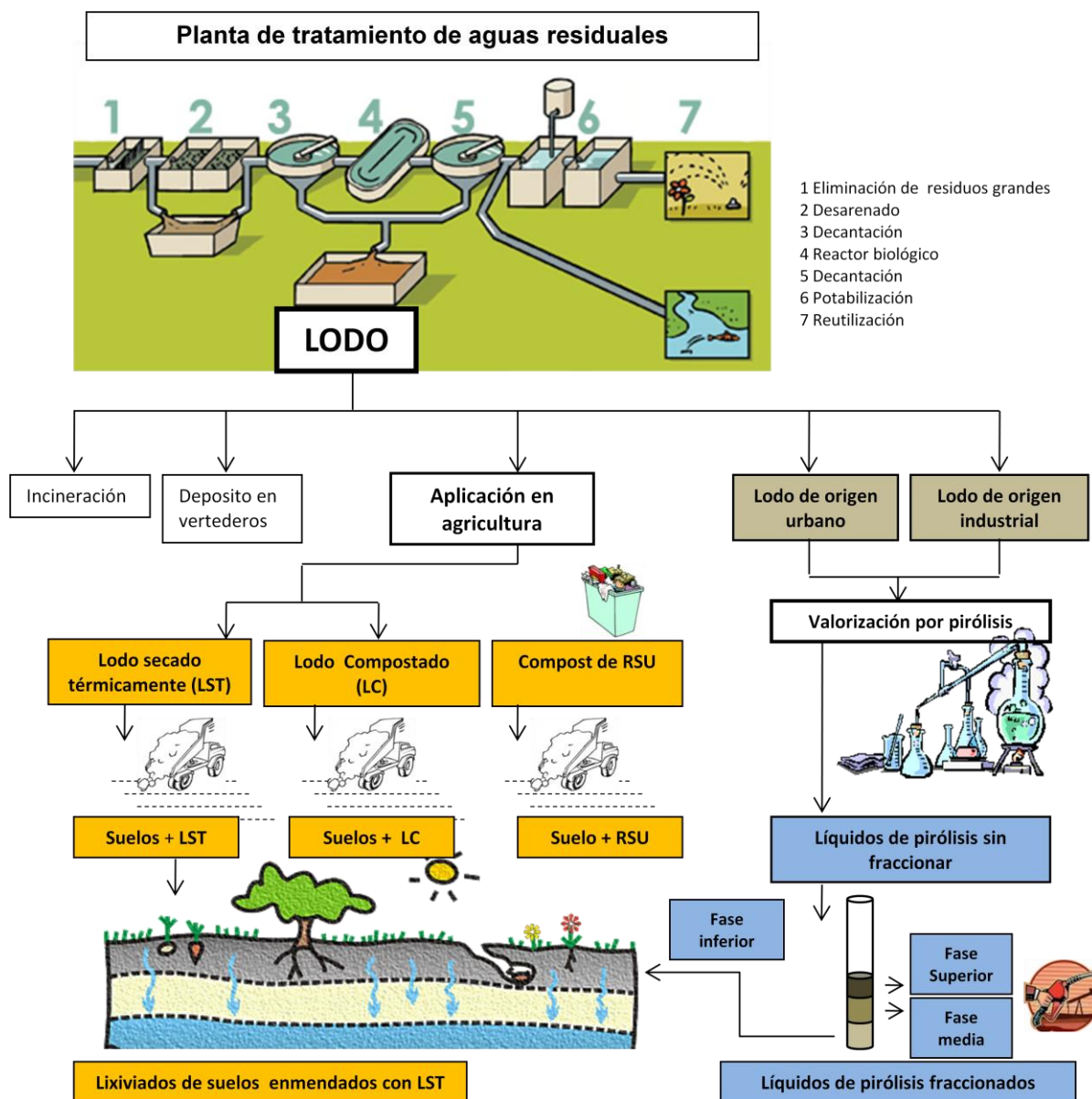


Figura 3.1. Mezclas complejas seleccionadas para la valoración ecotóxica, mutagénica y genotóxica. Se representan en color naranja las mezclas relacionadas con la agricultura, en color marrón las mezclas empleadas como materia prima para la obtención de productos con valor energético y en azul aquellas que se obtienen de la valorización de lodos de depuradora.

3.1.1 Mezclas complejas relacionadas con la agricultura

3.1.1.1 Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora

Las muestras de lixiviados fueron tomadas en la finca experimental “La Poveda” perteneciente al Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), situada en el tramo medio del río Jarama a unos 23 km de Madrid por la autovía Madrid-Valencia, en el término municipal de Arganda del Rey (Figura 3.2).



Figura 3.2 Vista aérea de la finca experimental “La Poveda” (delimitada en rojo) y de su entorno. El círculo amarillo indica la localización del terreno en el que se tomaron las muestras de lixiviados (Fuente: Modificado de Google Maps)

Las muestras se obtuvieron con lisímetros de succión (Figura 3.3), estos poseen un extremo terminal poroso de cerámica, que está conectado a un tubo que se continúa con una manguera de PBC.

Los lisímetros se introdujeron a 1,50m de profundidad en suelos sin enmendar y suelos enmendados con lodos de depuradora. Los lixiviados obtenidos fueron conservados en laboratorio a 4°C para realizar la caracterización físico-química y las diferentes evaluaciones toxicológicas. El muestreo se realizó de junio a diciembre del 2008 y 2009.

Material y métodos



Figura 3.3 Lisímetro de succión (Fuente: Propia)

3.1.1.2 Suelos agrícolas enmendados con lodo de depuradora, lodo compostado y compost de RSU

Las muestras de suelos enmendados con residuos fueron tomadas en la finca experimental “La Higuieruela”, perteneciente al Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC), situada en el término municipal de Santa Olalla (Toledo). Sus coordenadas geográficas son 40° 3' de latitud norte y 4° 26' de longitud oeste y se encuentra a una altitud media de 450 m sobre el nivel del mar (figura 3.4).



Figura 3.4. Vista aérea de la finca experimental “La Higuieruela” (delimitada en rojo) y de su entorno. El círculo amarillo indica la localización del terreno en el que se tomaron las muestras de lixiviados (Fuente: Modificado de Google Maps)

Se tomaron tres tipos de muestra, suelo sin enmendar, suelo enmendado con lodo secado térmicamente, suelo enmendado con lodo compostado y suelo enmendado con compost de RSU (Figura 3.5). Estos suelos forman parte del un proyecto de investigación dirigido por el Dr. Alfredo Polo del CSIC. Las diferentes enmiendas fueron aplicadas anualmente con una dosis de 80 t ha^{-1}

La toma de muestras se realizó antes de que se recogieran las cosechas (abril del 2008 y mayo 2009). Se empleó una sonda cilíndrica de tubo hueco y cabeza plana de 3.0 cm de diámetro, con un martillo accesorio para alcanzar los primeros 20 cm de la capa arable. Dentro de la misma parcela se realizó un muestreo en zigzag, tomando submuestras de suelo cada metro aproximadamente.

En todos los experimentos las submuestras se mezclaron y homogeneizaron y se conservaron a 4°C para luego realizar la caracterización físico-química y la evaluación toxicológica.



Figura 3.5. Arriba: a la izquierda, suelo control; a la derecha, suelo enmendado con compost RSU. Abajo: a la izquierda suelo control; a la derecha suelo enmendado con lodo secado térmicamente (Foto: Victor Franco).

Material y métodos

3.1.1.3 Enmiendas agrícolas: lodos de depuradora, lodo compostado y compost de RSU

Se recolectaron tres tipos de residuos que se aplican como enmiendas orgánicas en agricultura: Lodo de depuradora secado térmicamente, lodo compostado y compost de RSU.

El lodo de depuradora secado térmicamente fue obtenido de una planta de depuración de aguas residuales de Madrid. En planta, el lodo fue sometido a secado térmico (380°C - 450°C). Como producto final se obtienen *pellets* de alrededor 2,5 mm de diámetro (Figura 3.6, A)

El compost de RSU (Figura 3.6, B) y el lodo compostado (Figura 3.6, C) fue suministrado por la empresa TGM que composta los residuos urbanos en la planta de tratamiento y reciclaje de Valdemingómez (Madrid).



Figura 3.6. A) Lodo de depuradora, B) compost de residuos sólidos urbanos, C) Lodo compostado.

3.1.2 Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético.

Se obtuvieron muestras de dos tipos de lodos, uno generado en una planta de tratamiento de aguas residuales industriales de Madrid (Figura 3.7, A) y otro que proviene de una planta de tratamiento de aguas residuales de Valladolid (Figura 3.7, B). En cada planta los lodos fueron tratados mediante secado térmico (380 - 450°C). Como producto final se obtuvieron *pellets* de alrededor 2,5 mm de diámetro. Las muestras se conservaron a 4°C para posteriormente realizar la caracterización físico-química y la evaluación toxicológica.



Figura 3.7. Vista aérea de las estaciones depuradoras de aguas residuales A) Madrid Sur y B) Valladolid (Fuente: Dracema)

3.1.3 Mezclas complejas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora

3.1.3.1 Líquidos de pirólisis sin fraccionar, obtenidos a partir de lodos de depuradora

Los lodos secados térmicamente obtenidos de las estaciones depuradoras de Madrid y de Valladolid fueron transferidos al laboratorio del Grupo de Procesos Térmicos del Departamento de Ingeniería Química y Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza, para ser sometidos a procesos de pirólisis.

Cada lodo fue molido, tamizado y transferido a una tolva de alimentación (Figura 3.8, A), cuyo objetivo es alimentar con lodo al reactor de lecho fluidizado (Figura 3.8, B). En este último, se produjeron las reacciones de pirólisis a tres diferentes temperaturas: 450°C, 530°C y 650°C. Finalmente los líquidos atraviesan un circuito de condensadores de refrigeración para finalmente ser colectados (Figura 3.8, C). Los líquidos que se obtienen se denominan, líquidos de pirólisis sin fraccionar.

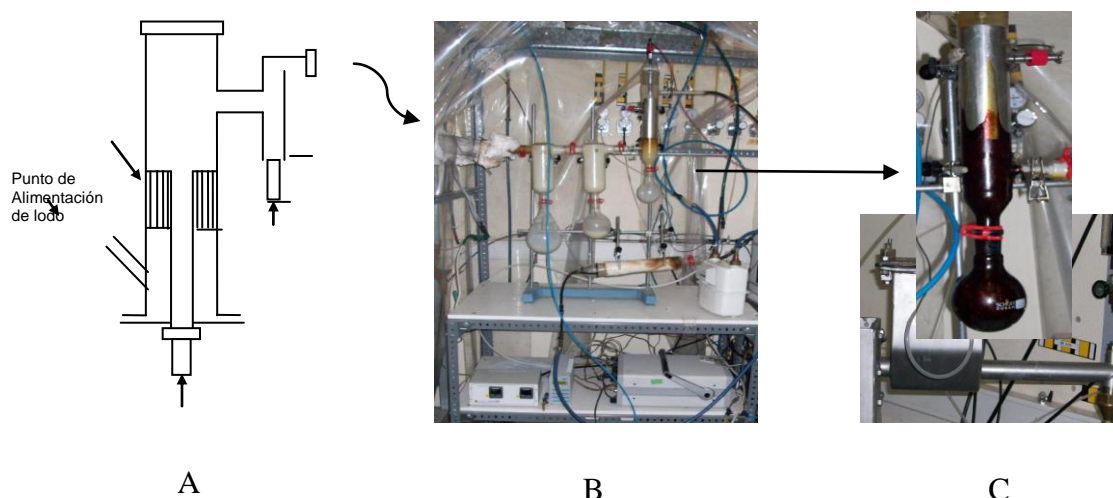


Figura 3.8. A: Reactor de lecho fluidizado, B: Condensadores, C: Líquido de pirólisis (Fuente: Laboratorio de Procesos Térmicos, UNIZAR)

Material y métodos

3.1.3.2 Líquidos de pirólisis fraccionados obtenidos a partir de lodos procedentes de plantas de depuración de aguas residuales urbanas e industriales.

Los líquidos de pirólisis obtenidos a 450°C, 530°C y 650°C, fueron fraccionados mediante centrifugación, conformándose así, tres fases: superior, media e inferior.

3.2 Preparación de Muestras

Las diferentes muestras exceptuando lixiviados y líquidos de pirólisis, fueron secadas y conservadas en laboratorio para proceder con la caracterización físico-química: pH, conductividad, macroelementos, microelementos. Paralelamente se prepararon extractos acuosos y diclorometánicos que fueron utilizados para realizar los análisis ecotóxico mutagénico y genotóxico.

3.2.1 Características físico-químicas

3.2.1.1 pH

El pH de las muestras exceptuando los suelos se midió en una suspensión muestra/agua 1:5 mediante un electrodo de vidrio, siguiendo el procedimiento propuesto por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1994).

Se pesaron 10 g de muestra y se añadieron 50 mL de agua destilada. Se sometió la suspensión a agitación durante 10 minutos y se dejó reposar durante 30. Seguidamente, se agitó de nuevo y se realizó la medida con un pH-metro con compensación automática de temperatura (CRISON micro pH 2001).

El pH de las muestras de suelos se midió en una suspensión suelo/agua 1:2.5 mediante un electrodo de vidrio, siguiendo procedimiento anteriormente descrito.

3.2.1.2 Conductividad eléctrica

Se pesaron 10 g de las diferentes muestras y se añadieron 50 mL de agua destilada. Después de someter la suspensión a agitación durante media hora, se centrifugó a 15300 g, se filtró y se midió la conductividad eléctrica en el extracto con un conductímetro CRISON micro CM 2201.

3.2.1.3 Contenido de macroelementos

Los macroelementos calcio, magnesio, sodio y potasio se extrajeron en una relación 1:10 de muestra con acetato amónico 1 M (pH 7). Dicha suspensión se agitó durante 10 minutos y se filtró. En el extracto así obtenido, se midieron sodio, potasio y calcio por fotometría de llama (Eppendorf Elex 6361), y el magnesio mediante espectrofotometría de emisión de plasma (Perkin Elmer ICP/5500).

Por otro lado, el contenido de fósforo se determinó según el método descrito por Burriel y Hernando (1950). Para ello, se tomó 1 g de suelo y se puso en un frasco de 250 mL al que se añadieron 100 mL de la solución extractante, compuesta de 1 g de carbonato cálcico, 0.88 g de carbonato magnésico, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y 24.5 mL de ácido acético al 98% diluyéndolo en 10 L de agua destilada y ajustando el pH entre 3.2 y 3.3. La solución se agitó durante cinco minutos, se filtró y se determinó el fósforo por colorimetría en un autoanalizador Technicon AAII.

3.2.1.4 Determinación de microelementos

Para el análisis de los contenidos totales de hierro, manganeso, zinc y cobre en las muestras, se pesaron 0.5 g de muestra y se añadieron 12 mL de ácido nítrico concentrado. A continuación, se calentó la mezcla a 180 °C en digestor durante dos horas. Pasado este tiempo, se dejó enfriar, se transvasó a un erlenmeyer y se evaporó hasta 1 mL en un baño de arena. Posteriormente, se añadieron 5 mL de ácido perclórico concentrado y se dejó evaporar a sequedad en el mismo baño de arena. El residuo se diluyó con agua destilada y se filtró con papel lavado a los ácidos, aforándose finalmente a 50 mL. Seguidamente, se realizó la medida con un espectrofotómetro de emisión de plasma Perkin Elmer ICP/5500.

El análisis de los contenidos de plomo, cadmio, cromo y níquel se realizó por espectrometría de emisión de plasma, previa extracción con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), siguiendo el método propuesto por Lindsay y Norvell (1978). Se pesaron 10 g de suelo y se añadieron 30 mL de una solución de DTPA ajustada a pH 7.3 (DTPA 0.005 M, cloruro cálcico 0.01 M y trietanolamina 0.1 M). Se agitó durante dos horas, se centrifugó a 15300 g y se filtró. En el extracto se analizaron

Material y métodos

los micronutrientes mediante espectrometría de emisión de plasma con un Perkin Elmer ICP/5500.

3.2.1.5 Preparación de extractos

Se prepararon extractos acuosos y diclorometánicos de enmiendas orgánicas, suelos enmendados y residuos destinados a la valorización energética.

Para ello se tamizaron las muestras con mallas de 2mm, posteriormente se pesaron 10 g de muestra que fue diluida con 100 ml de agua destilada para los extractos acuosos y agua destilada mas diclorometano al 5% para los extractos diclorometánicos.

Los preparados se mantuvieron en agitación durante 24 horas a 20 rpm, posteriormente se rescató el sobrenadante y se pasó por papel filtro Wathman N° 3.

3.3 Ensayos biológicos

En la tabla 3.1 se resumen los ensayos biológicos empleados para cada una de las muestras evaluadas en este trabajo.

Tabla 3.1. Resumen de los ensayos biológicos a los que fueron sometidas las diferentes muestras

Tratamientos		Ensayos biológicos					
		Ecotoxicidad		Mutagenicidad Test de Ames			Genotoxi- cidad
		Germina- ción	Biolumi- niscencia	IPE	IPPI	IPLV	SMART
Lixiviados		✓	✓	✓			
Suelos							
• Suelo enmendado con lodo secado térmicamente.	SL*	✓	✓	✓			
• Suelo enmendado con lodo compostado.	SLC*	✓	✓	✓			
• Suelo enmendado con compost de RSU.	SC*	✓	✓	✓			
Enmiendas							
• Lodo secado térmicamente.	L*	✓	✓	✓			
• Lodo compostado.	LC*	✓	✓	✓			
• Compost de RSU.	C*	✓	✓	✓			
Lodos para valorización							
• Lodo de origen industrial Madrid.	LMS*	✓	✓	✓			
• Lodo de origen urbano Valladolid.	LV*	✓	✓	✓			
Líquidos de pirólisis							
• Líquido de pirólisis Madrid, obtenido a 450°C.	M450	✓	✓	✓	✓	✓	✓
• Líquido de pirólisis Madrid, obtenidos a 530°C.	M530	✓	✓	✓	✓	✓	✓
• Líquido de pirólisis Madrid, obtenido a 650°C.	M650	✓	✓	✓	✓	✓	✓
• Líquido de pirólisis Valladolid, obtenido a 450°C.	V450	✓	✓	✓	✓	✓	✓
• Líquido de pirólisis Valladolid, obtenido a 530°C.	V530	✓	✓	✓	✓	✓	✓
• Líquido de pirólisis Valladolid, obtenido a 650°C.	V650	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fases de líquidos de pirólisis							
• Superior 450°C	Sup450			✓			
• Media 450°C	Med450			✓			
• Inferior 450°C	Inf450	✓	✓	✓			
• Superior 530°C	Sup530			✓			
• Media 530°C	Med530			✓			
• Inferior 530°C	Inf530	✓	✓	✓	✓	✓	✓
• Superior 650°C	Sup650			✓			
• Media 650°C	Med650			✓			
• Inferior 650°C	Inf650	✓	✓	✓			

* Muestras de las que se evaluaron extractos acuosos y diclorometánicos.

IPE= Test de Salmonella/microsoma de incorporación de placa estándar, IPPI =Incorporación en placa con pre-incubación, IPLV=Incorporación en placa para líquidos volátiles.

Material y métodos

3.3.1 Ensayo de germinación en semillas de *Lepidium sativum*

3.3.1.1 Fundamento

El ensayo de germinación en semillas de *Lepidium sativum* (berro) es una prueba estática de toxicidad aguda. Este ensayo permite evaluar los efectos fitotóxicos producidos en el proceso de germinación de semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo (Figura 3.9).

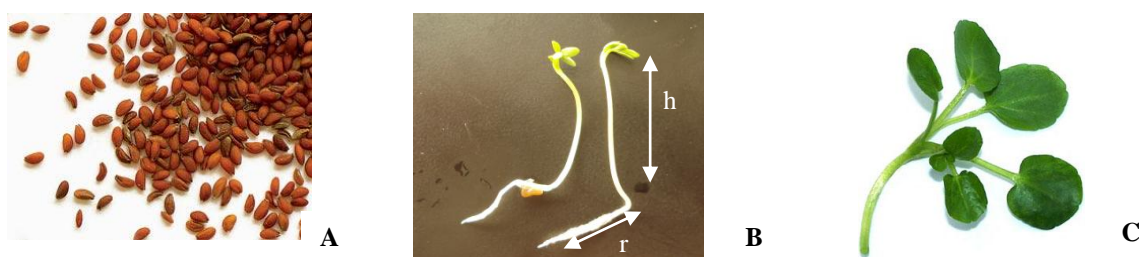


Figura 3.9. *Lepidium sativum*: A) Semillas, B) formación de radícula (r) e hipocótilo (h), C) Planta madura

3.3.1.2 Reactivos

Zinc (II)

3.3.1.3 Procedimiento

- Se introdujeron 30 semillas de *Lepidium sativum* en cajas petri (100 mm Ø) que contenían papel de filtro Whatman N° 3 (90 mm Ø) saturado con 5 ml de la dilución. Agua destilada fue utilizada como control y Zinc (II) como compuesto tóxico de referencia.
- Cada caja petri fue tapada y sellada con cinta parafilm para evitar la pérdida de humedad.
- Durante 72 horas, a 25 °C y en ausencia de luz fueron incubados los diferentes tratamientos.
- Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las diluciones.

- Finalizada la incubación se procedió a cuantificar el número de semillas para determinar el porcentaje de germinación (%GR), el porcentaje de longitud radicular (%LR), el Índice de germinación (IG). Se tomo como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

$$\%GR = (\text{Media semillas germinadas en el tratamiento} / \text{Media semillas germinadas en el control}) \times 100$$

$$\%LR = (\text{Media longitud radícula en el tratamiento} / \text{Media longitud radícula en el control}) \times 100$$

$$IG = (\%GR \times \%LR) / 100$$

- Con ayuda de papel milimetrado se midió la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada una de las plántulas. La figura 3.10 resume el procedimiento

3.3.1.4 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza unifactorial (ANOVA) usando el software estadístico SPSS para Windows versión 18.0. Este análisis fue combinado con el ensayo *post hoc* de Tukey. Considerándose como significativos aquellos valores con un p-valor $\leq 0,05$.

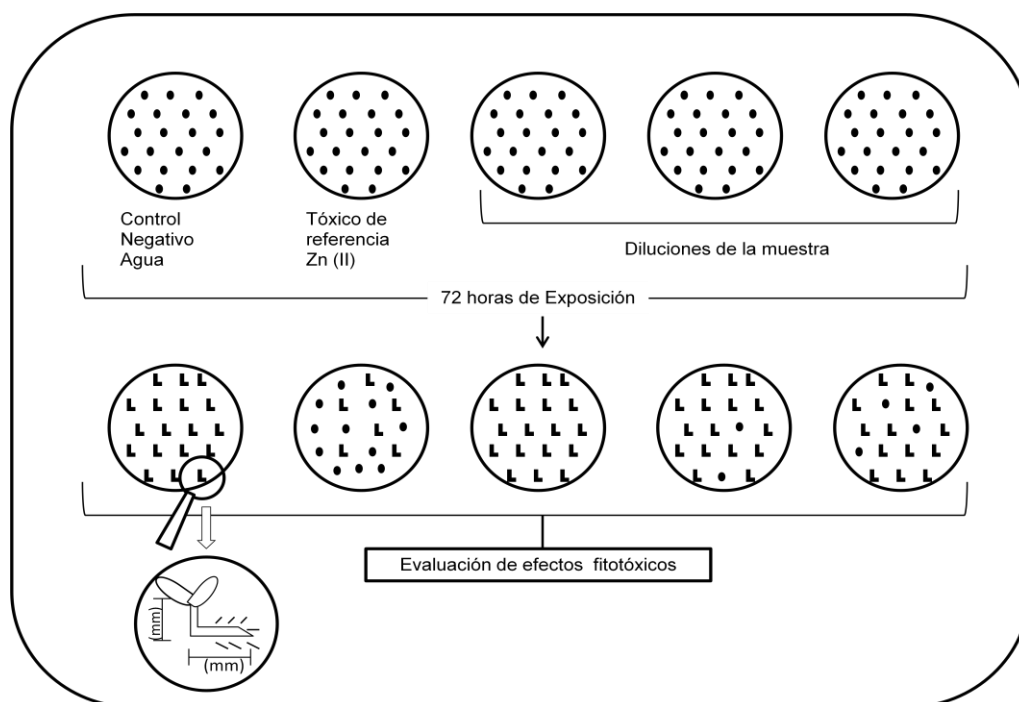


Figura 3.10. Esquema general de la prueba de toxicidad con semillas de *L. sativum*

Material y métodos

3.3.2 Ensayo de inhibición de luminiscencia en *Vibrio fischeri*

3.3.2.1 Fundamento

La prueba se basa en la medición de la luminiscencia emitida por la bacteria *Vibrio fischeri* (Figura 3.11, A) después de su exposición a una muestra problema por un periodo de 15 a 30 minutos. La intensidad de la luz emitida por las bacterias expuestas a la muestra problema se compara con la emitida por bacterias que permanecen en las condiciones óptimas del sistema control. Ante la presencia de sustancias tóxicas, la luminiscencia de *V. fischeri* disminuye de forma proporcional a la carga tóxica en la muestra problema. Este decaimiento se produce como resultado del daño ocasionado a los procesos metabólicos asociados con la respiración bacteriana. Se ha seguido el protocolo estandarizado ISO11348-3.

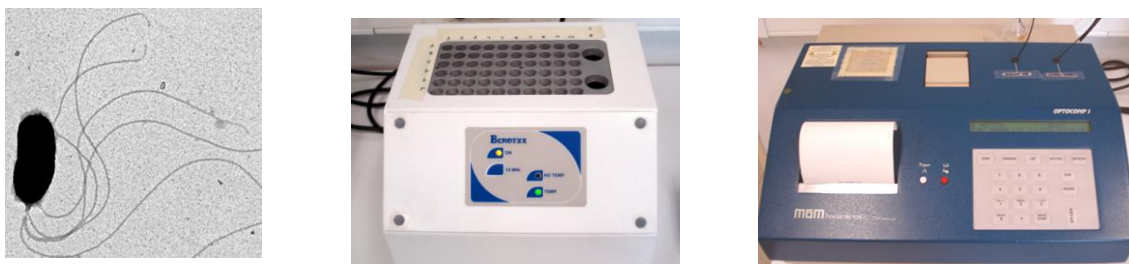


Figura 3.11. A) *Vibrio fischeri*, B) Pozos de incubación, C) Luminómetro

3.3.2.2 Reactivos

Reactivo liofilizado (bacteria liofilizada)

Solución diluyente (Solución de cloruro de sodio al 2%)

Solución de ajuste osmótico (solución de cloruro de sodio al 22%)

Solución de reconstitución (agua deionizada)

3.3.2.3 Procedimiento

- Se midió el pH de todas las muestras. Si el pH estaba comprendido entre 6 - 8,5 no se realizó ningún ajuste.

- Se empleó la solución de ajuste osmótico para estabilizar la salinidad de las muestras y así generar un medio con óptima presión osmótica.
- Diferentes diluciones de la muestra se colocaron en viales que fueron introducidos en pozos de incubación (Figura 3.11, B), con temperatura controlada a 15 ± 1 °C, paralelamente se suspende la bacteria liofilizada.
- Se empleó cloruro de sodio 2% para suspender la bacteria liofilizada y se dejó reposar 15 minutos a 15°C para que la bacteria se hidrate y revitalize.
- Se añadió 500 µl de suspensión de bacterias a 500 µl de cada una de las diluciones.
- Con ayuda de un luminómetro (Figura 3,11, C) se mide la luminiscencia a los 0, 15 y 30 minutos.
- Todo el proceso se llevó a cabo a 15°C y cada dilución fue evaluada por duplicado.
- Se ha empleado sulfato de zinc como tóxico de referencia.

3.3.2.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresan a través de la concentración efectiva CE_{50} determinada por un gráfico logarítmico de la concentración de la muestra versus porcentaje de reducción en la intensidad lumínica.

Para el tratamiento de los datos se determina en primer lugar el factor de corrección (valor f_{kt}) a partir de la intensidad de luminiscencia medida (en RLU) utilizando la ecuación A. Este factor sirve para corregir los valores iniciales I_0 de todas las muestras de ensayo, antes de que puedan utilizarse como valores de referencia para la determinación de la disminución de luminiscencia provocada por la muestra.

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_{k0}} \quad \boxed{t = 15 \text{ ó } 30 \text{ min}} \quad (A)$$

Donde f_{kt} es el factor de corrección para el tiempo de contacto t ; I_{kt} es la intensidad de luminiscencia en el control tras un tiempo de contacto t en unidades de luminiscencia relativa (RLU); e I_{k0} es la intensidad de luminiscencia inicial en el control.

A partir de la ecuación A se puede determinar el valor corregido (I_{ct}) de la intensidad inicial emitida por las bacterias previamente a su exposición a las muestras conteniendo sustancias tóxicas (ecuación B):

Material y métodos

$$I_{ct} = I_0 \times f_{kt} \quad (B)$$

El efecto inhibitor de la muestra de ensayo se calcula entonces a partir de la ecuación C.

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \times 100 \quad (C)$$

Donde H_t es el efecto inhibitor en tanto por ciento de la muestra de ensayo tras un tiempo de contacto de t , e I_{Tt} es la intensidad de luminiscencia de la muestra de ensayo tras el tiempo de exposición t , en unidades de luminiscencia relativa.

A continuación, se calcula el efecto inhibitor medio (H_t) para cada una de las diluciones preparadas cuyo CE50 se quiere determinar. Todas las muestras se analizan por duplicado.

Para la evaluación de las relaciones concentración/efecto, y la determinación del valor de CE50 correspondiente a un contaminante determinado, es necesario calcular para cada nivel de dilución el valor de gamma (Γ) (ecuación D), que se define como la relación entre la pérdida de emisión de luz inicial y la emitida tras un período de exposición, para una concentración específica de sustancias tóxicas.

$$\Gamma_t = \frac{\bar{H}_t}{100 - \bar{H}_t} \dots\dots(D)$$

La relación entre " Γ " y la concentración del contaminante puede ser expresada en forma de ecuación lineal (ecuación E). Dicha ecuación permite determinar el valor de concentración correspondiente a una inhibición determinada. Para el caso de la concentración efectiva que inhibe al 50% de la actividad bioluminiscente de la bacteria (CE50), el valor de Γ es 1.

$$\text{Log } C_t = b \text{ Log } \Gamma_t + \text{Log } a \quad (E)$$

Se calcula, por el método de mínimos cuadrados, los valores de CE₅₀ para cada muestra, mediante la sustitución en la ecuación E del valor $\Gamma = 1$ con sus correspondientes intervalos de confianza al 95%.

3.3.3 Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*

3.3.3.1 Fundamento

El ensayo de *Salmonella typhimurium* (Figura 3.12) emplea cepas construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por desplazamiento del marco de lectura (*frameshift*) o por sustitución de pares de bases del ADN. Las diferentes cepas son auxotróficas para la histidina, (*His⁻*) estas son expuestas a las muestras problema y son introducidas en placas de agar con

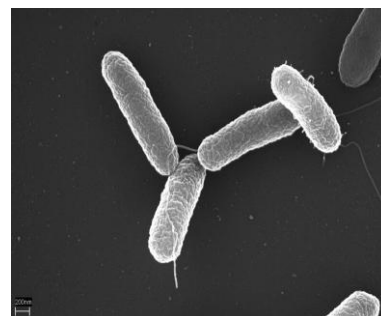


Figura 3.12. *Salmonella typhimurium*

trazas de histidina/biotina. Dada la composición del medio de cultivo, se forman colonias revertientes con las células prototróficas para la histidina (*his⁺*), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por las muestras problema. Después de un periodo de incubación de 48 horas, las colonias revertientes se contabilizan. El valor igual o mayor a dos, de la expresión obtenida de dividir el número de revertientes en las placas de prueba entre el número de revertientes de las placas control, indica la presencia de actividad mutagénica en la muestra problema.

3.3.3.2 Reactivos

- | | |
|--|--|
| • Cloruro de Magnesio (Merck, Alemania). | • L-Histidina (Merck). |
| • Cloruro Potásico (Merck). | • Glucosa (Merck). |
| • Difco Bacto Nutrient Broth (BD, EE.UU.). | • DMSO (Merck). |
| • Difco Bacto Agar (BD). | • 4-Nitroquinolina-N-óxido (NQO: Sigma Aldrich). |
| • Fosfato Sódico (Merck). | • Metilmetanosulfonato (MMS; Merck). |
| • D-Biotina (Merck). | • Metilglioxal (MG: Sigma Aldrich). |

3.3.3.3 Procedimiento método de incorporación en placa estándar (IPE)

Para aplicar este método la investigación se ha basado en Maron y Ames, 1983; Barrueco y col., 1991 y Barber y col., 1980. Mediante este método existe una exposición directa de *Salmonella typhimurium* a las muestras problema (Figura 3.13).

Material y métodos

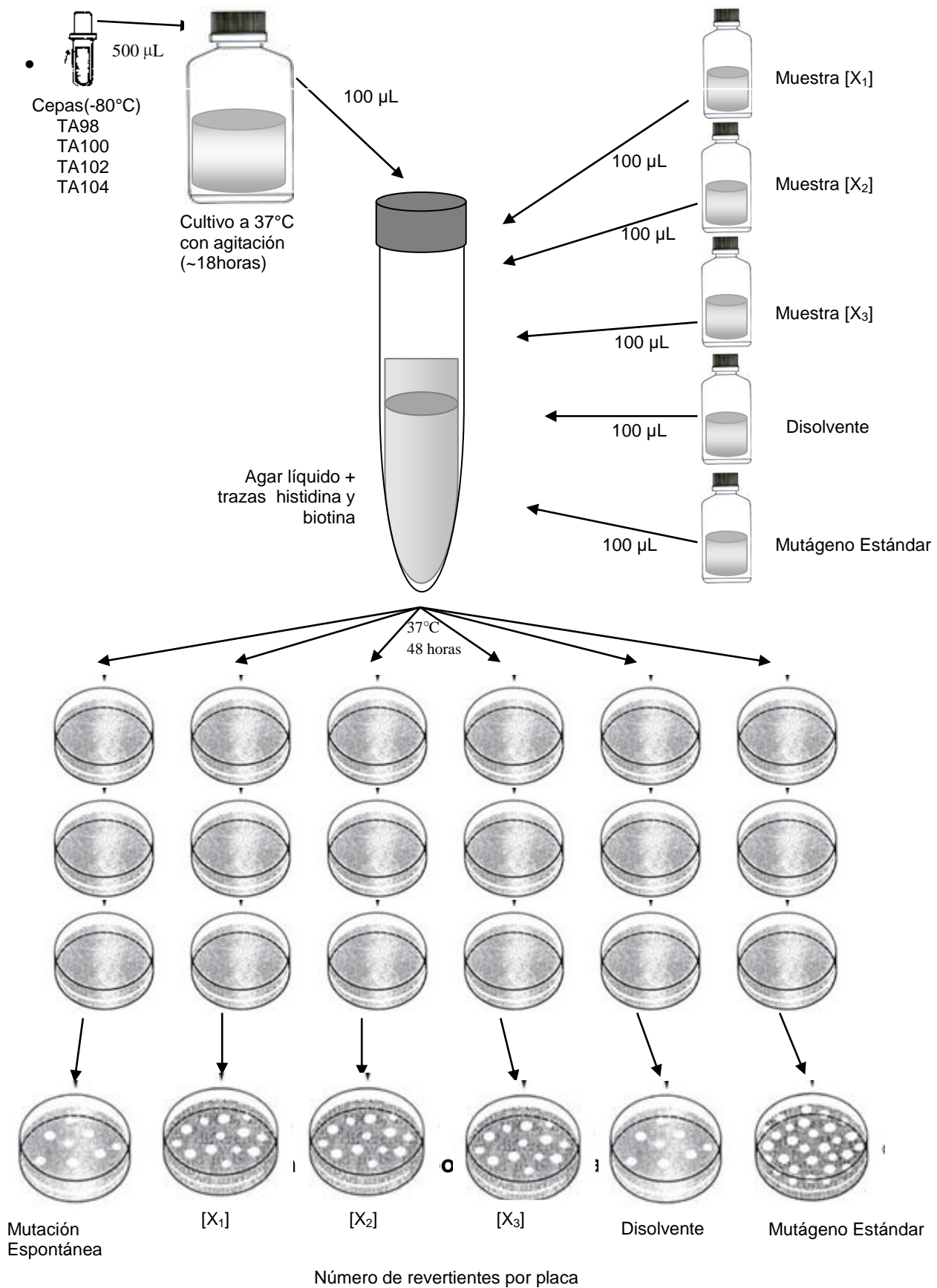


Figura 3.13. Esquema general del ensayo de incorporación estándar en placa de *S. typhimurium*

- Se dejó crecer 500 µl de cepa bacteriana en 50 ml de *Bacto Nutrient Broth* durante 16 horas, a 37°C, en oscuridad y con agitación (cultivo de noche).
- Se preparó por triplicado para cada tratamiento (controles, mutágenos estándar y muestras), placas de agar mínimo suplementado con glucosa.
- Se añadieron 100 µl del cultivo de noche a 2ml de agar líquido suplementado con 0.2 ml de una solución 0.5 mM de histidina/biotina para los controles de reversión espontánea. Además, en cada caso, se añadió 100 µl del disolvente, o de la muestra en estudio, o del mutágeno estándar.
- Se homogenizó la mezcla del agar líquido y se extendió sobre placas con agar mínimo glucosado (20 ml).
- Se incubaron las placas durante 48 horas, a 37°C y en oscuridad.
- Se cuantificó el número de revertientes/placa.

3.3.3.4 Procedimiento método incorporación en placa con pre-incubación (IPPI)

El ensayo de pre-incubación es una variante del ensayo de incorporación en placa estándar. Se incuban por un corto periodo de tiempo, las cepas y las muestras a evaluar, antes de realizar la incubación final.

- Se dejó crecer 500 µl de la cepa bacteriana en cultivo de noche durante 16 horas, a 37°C, en oscuridad y con agitación.
- Se preparó por triplicado placas de agar mínimo suplementado con glucosa, para los diferentes tratamientos.
- Se añadió 100 µl del cultivo de noche a 100 µl del disolvente, o de la concentración de estudio, o del mutágeno estándar de la cepa.
- Los diferentes tratamientos se incubaron durante 20 minutos, a 37°C, en oscuridad y con agitación.
- Se añadió 2 ml de agar líquido suplementado con histidina/biotina a cada tratamiento.
- Se homogenizó cada mezcla y se extendió sobre placas con agar glucosado.
- Se incubaron las placas durante 48 horas, a 37°C en oscuridad.
- Se cuantificó el número de colonias revertientes.

Material y métodos

3.3.3.5 Procedimiento método incorporación en placa para líquidos volátiles (IPLV)

El método para líquidos volátiles es otra variante del método de IPE. Se ha seguido el protocolo propuesto por Mortelmans y Zeiger (2000).

- Se dejó crecer 500 µl de la cepa bacteriana en cultivo de noche durante 16 horas, a 37°C, en oscuridad y con agitación.
- Se preparó por triplicado placas de agar mínimo suplementado con glucosa, para los diferentes tratamientos.
- Se añadieron 100 µl del cultivo de noche a 2 ml de agar líquido suplementado con 0.2 ml de una solución 0.5 mM de histidina/biotina para los controles de reversión espontánea. Además, en cada caso, se adicionó 100 µl del disolvente, o de la concentración de estudio, o del mutágeno estándar de la cepa.
- Se homogenizó la mezcla del agar líquido y se extendió sobre placas con agar glucosado.
- Las placas se sellaron herméticamente y además se colocaron dentro de una cámara hermética (Figura 3.14).
- La cámara con las placas se incubaron durante 48 horas, a 37°C y en oscuridad.
- Se cuantificó el número de revertientes/placa.

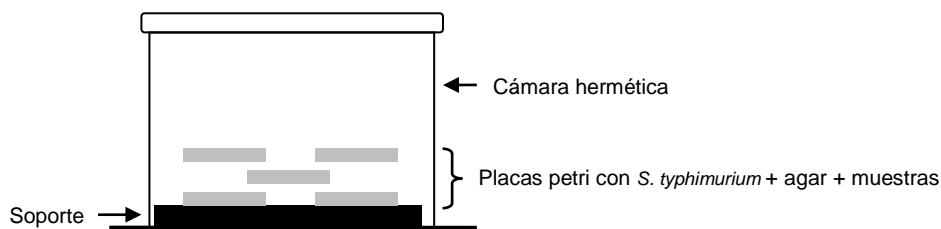


Figura 3.14. Cámara para líquidos volátiles

3.3.3.6 Preparación de la fracción microsomal S9

La metodología empleada para la preparación de la fracción microsomal S9 fue realizada de acuerdo a los protocolos establecidos por Maron y Ames (1983) y Barrueco y col. (1991).

- Ratones la especie *Mus musculus* fueron inducidos con fenobarbital sódico al 0.1% durante 7 días y β -naftoflavona un día antes de ser sacrificados (Figura 3.15 A y B).

- Los hígados fueron extraídos, lavados y homogenizados con cloruro de potasio (Figura 3.15 C).
- Los homogenizados fueron centrifugados a 9000 g durante 20 min manteniendo una temperatura de 4 °C.
- Se rescató el sobrenadante (S9) y se rescató el sobrenadante y se guardó en criotubos a -80°C.

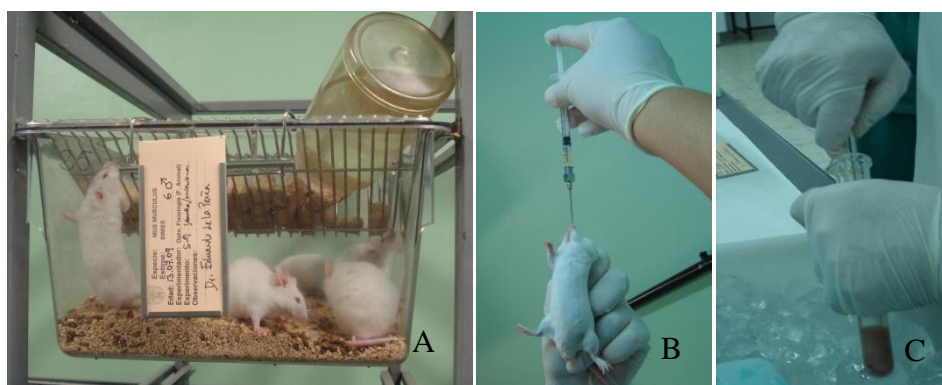


Figura 3.15 A) Ratones *Mus musculus* inducidos con fenobarbital sódico, B) Administración oral de β -Naftoflavona, C) Homogenizado de hígado (Fuente: Propia)

3.3.3.7 Mezcla S9

La combinación de la fracción S9 y los cofactores se denomina mezcla S9. La mezcla fue preparada en una campana de flujo laminar, manteniendo en hielo todos los componentes:

Componentes	Volumen (μ l)
Agua destilada	375
Solución amortiguadora fosfato	500
Solución de glucosa 6-fosfato	5
Solución de NADP	40
Solución de cloruro de potasio 1,65 M	20
Solución de cloruro de magnesio 0,4 M	20
Fracción S9	40

3.3.3.8 Análisis estadístico

Se calcula la media de los triplicados, se determina la desviación estándar, el índice de mutación y se grafican los resultados mediante el programa de Microsoft® Office Excel® 2003 y S-Plus 2000 Springer Student Edition para Windows.

Material y métodos

El índice de mutación se calcula mediante la fórmula: $I_m = \frac{R - R_c}{R_c}$

Siendo R la media de los revertientes en el caso de estudio y R_c la media de los revertientes en las placas control. Se considera que la muestra es mutagénica si su índice de mutación es mayor o igual a 2.5.

3.3.4 Ensayo de genotoxicidad en *Drosophila melanogaster*

3.3.4.1 Fundamento

Las células diana del ensayo *in vivo* SMART en alas de *D. melanogaster* son los discos imaginales (células somáticas de la etapa de larva) (Figura 3.16), que proliferan mitóticamente hasta el punto en que se diferencian durante la metamorfosis, en estructuras que van a originar las alas de la mosca adulta.

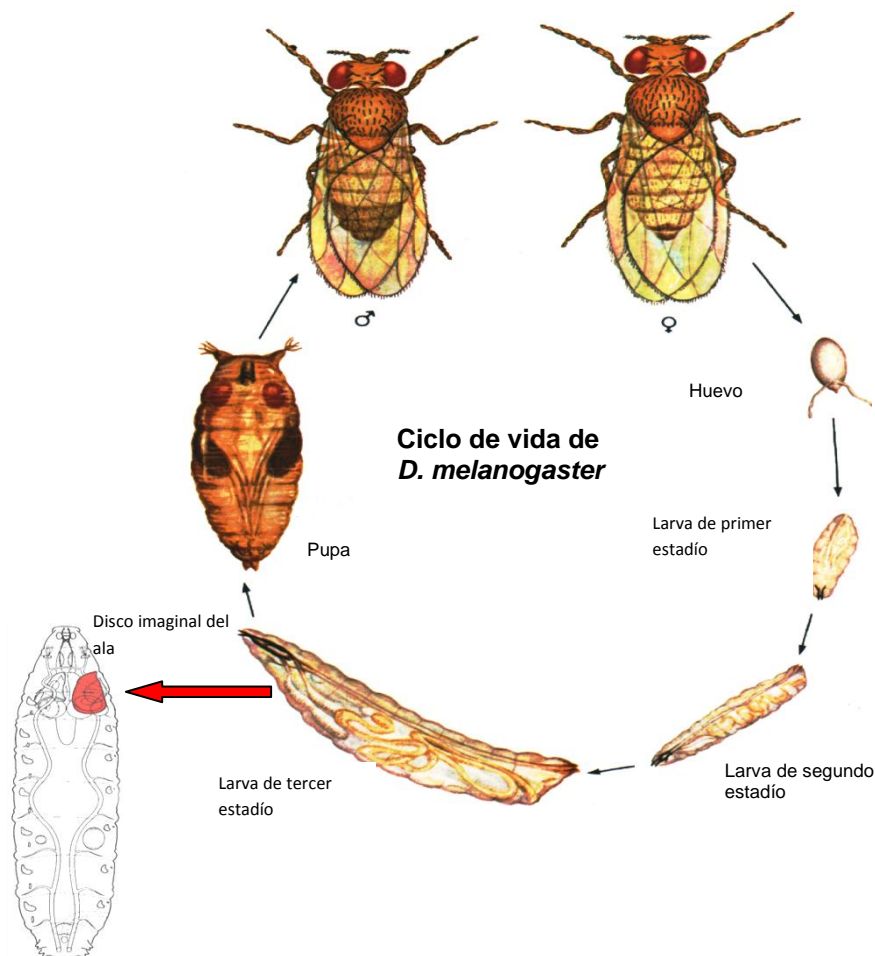


Figura 3.16. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. En la larva de tercer estadio se muestra la ubicación de los discos imaginales de las alas.

La técnica se basa en analizar la pérdida de heterocigosidad de los genes marcadores *mwh* y *flr*, presentes en las células diana. Así las alteraciones genéticas inducidas en estas células diana se detectan después de las metamorfosis. Las células mutantes diferenciadas fenotípicamente en el ala son conocidas como clones mutantes (Carmona, 2009).

3.3.4.2 Reactivos

- Éter de petróleo
- Etanol 60%
- Metil metano sulfonato
- Solución de Faure (Goma arábica, glicerol, hidrato de cloral, agua).
- Medio instantáneo Carolina Biological Supply, Formula 424.

3.3.4.3 Procedimiento

- Se realizan dos tipos de cruzamientos empleando las siguientes cepas de *Drosophila melanogaster*:

Cruzamiento estándar:

♀ *flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep 1(3)89Aa bx^{34e} & Bd^s* X ♂ *mwh/mwh*

Cruzamiento de alta bioactivación:

♀ *ORR/ORR; flr³/In(3LR) TM3, ri p^o sep 1(3)89Aa bx^{34e} & Bd^s* X ♂ *mwh/mwh*

- Las larvas de tercer estadio procedentes de los cruces estándar y alta bioactivación, se alimentan con 1,5 g de *Drosophila Instant Medium* (Carolina Biological Supply, Burlington) y 5 ml de la solución a evaluar. El número de larvas por vial fue de 200, a fin de realizar paralelamente el análisis de supervivencia y determinación del efecto genotóxico.

Material y métodos

- Las larvas permanecieron en los viales hasta completar su desarrollo. Después de la eclosión, las moscas adultas fueron colectadas y fijadas en etanol al 70%. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a 25°C y 60% de humedad relativa.
- De acuerdo a la morfología de las alas las moscas fueron divididas en dos grupos: heterocigotos (*mwh/TM3*), y trans-heterocigotos (*mwh/flr³*) (Figura 3.17).
- Las alas de los individuos trans-heterocigotos fueron fijadas con solución Faure en portaobjetos, según el procedimiento de Graf y col. (1984).
- Las diferentes secciones de ambos lados del ala (Figura 3.17) fueron analizados a microscopio en busca de “manchas”.

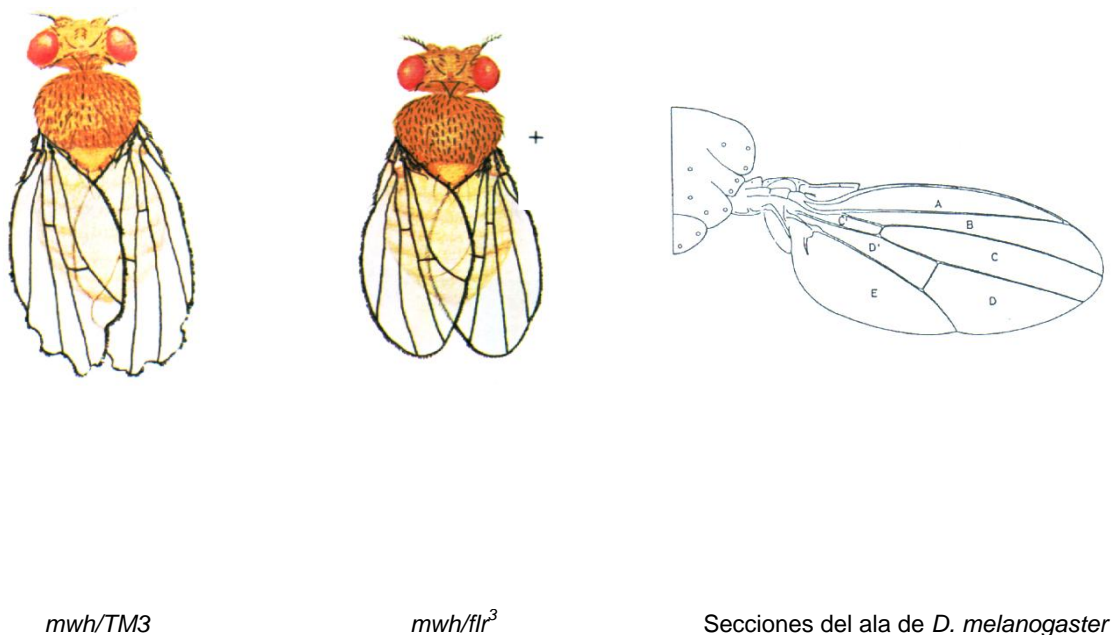


Figura 3.17. Morfología de las alas de la progenie heterocigota *mwh/TM3*), trans-heterocigota (*mwh/flr³*) y secciones del ala.

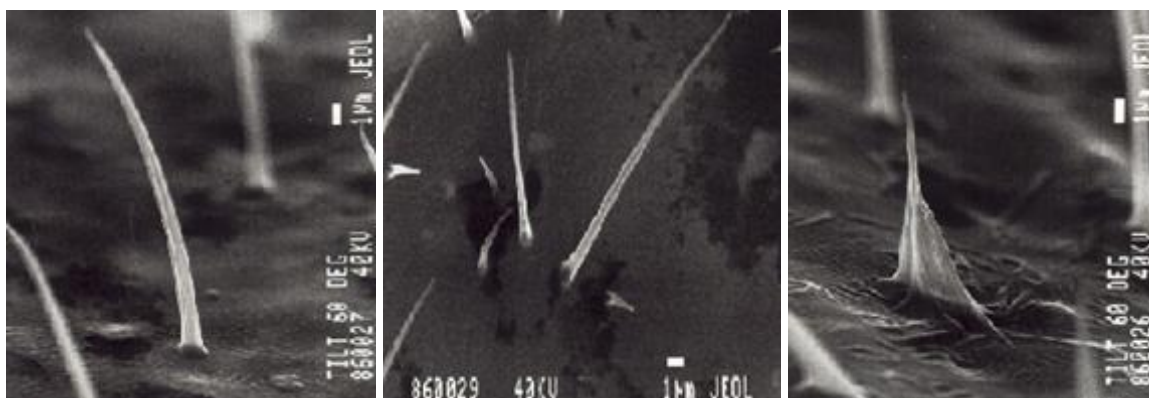


Figura 3.18. Marcadores fenotípicos A) Normal o silvestre, B) *mwh*, C) *Flr³*

(Fuente: Heloisa Rodrigues)

- Las manchas, se clasificaron de la siguiente manera:
 - a) Manchas simples *mwh*. Corresponden aquellas cuyas células presentan tres o más pelos, a diferencia de los de fenotipo salvaje, que presentan un solo pelo o tricoma por célula (Figura 3.18 B).
 - b) Manchas simples *flr³*. Corresponden aquellas células que presentan una expresión fenotípica variable, desde pelos cortos, gruesos, deformes, hasta pelos amorfos de apariencia globular. Este fenotipo (Figura 3.18 C) no suele manifestarse completamente en sectores de menos de cuatro células. Tampoco es frecuente encontrar clones *flr³* muy grandes, debido posiblemente a su efecto letal.
 - c) Manchas gemelas. Están formados por células adyacentes de fenotipo *mwh* y *flr³*, respectivamente.

Como criterio general, las diversas manchas encontradas en las alas se agrupan en tres categorías distintas:

- * Manchas simples pequeñas, implican la presencia de una o dos células mutantes *mwh* o *flr³* (Figura 3.19 A).
- * Manchas simples grandes, corresponden a tres o más células mutantes *mwh* o *flr³* (Figura 3.19 B y C)

Material y métodos

* Manchas gemelas, formadas por células mutantes *mwh* y *flr3* (Figura 3.18)

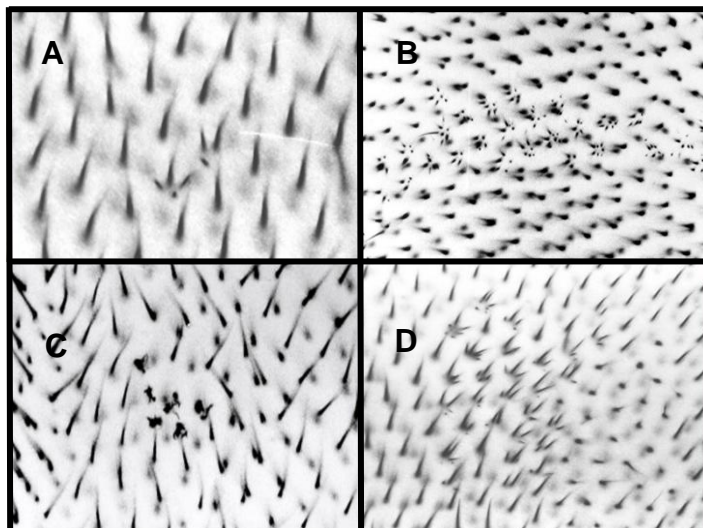


Figura 3.19. Sectores mutantes que se observan en el ala de *Drosophila melanogaster*.

3.3.4.4 Análisis estadístico

Para la evaluación de los efectos genotóxicos de las diferentes mezclas complejas se utilizó la prueba de doble decisión propuesta por Frei y Würigler (1988). Esta prueba estadística determina si la frecuencia de manchas que se encuentra en la serie tratada difiere significativamente de la hallada en el control, que corresponde a la frecuencia espontánea de manchas. La ventaja de la utilización de este estadístico es que permite emitir un diagnóstico en el que los resultados pueden clasificarse como positivo, débil positivo, negativo o inconcluyente (Selby y Olson, 1981). Estas hipótesis son:

- Hipótesis nula (H_0): no hay diferencia en la frecuencia de manchas entre el tratamiento y el control.
- Hipótesis alternativa (H_A): el tratamiento supone un incremento de m veces la frecuencia de manchas comparada con la frecuencia espontánea esperada. El factor de multiplicación m se fija de forma empírica en función de las frecuencias espontáneas observadas y siguiendo la práctica común en otros ensayos de genotoxicidad. Los valores de m utilizados fueron: 2 para manchas pequeñas y totales y 5 para manchas grandes y dobles, ya que ambos tipos aparecen con una frecuencia espontánea muy baja.

Si se rechaza la H_0 , implica que el tratamiento origina un incremento significativo de la frecuencia de manchas. Si además, se rechaza la H_A , significa que el tratamiento no produce el incremento requerido para considerar el compuesto como un claro genotóxico. En este caso se clasifica como genotóxico débil.

Por otro lado si no se rechaza ninguna de las dos hipótesis, los resultados se consideran inconcluyentes, ya que ambas hipótesis son mutuamente excluyentes y no pueden ser aceptadas a la vez.

De acuerdo con Frei y Würigler (1988), para comprobar las dos hipótesis se pueden utilizar los siguientes métodos:

- La prueba binomial condicional (Kastenbaum y Bowman 1970; Margolin y col., 1983).
- La prueba de proporciones

Los dos métodos son en principio equivalentes y tienen la ventaja de que no se necesita estimar la frecuencia espontánea de manchas para comprobar la H_A . En este trabajo se ha utilizado la prueba binomial condicional.

Para cada concentración y compuesto evaluado, se calculó la frecuencia de inducción de manchas por célula. Esto permite una comparación de la actividad genotóxica de diferentes agentes o sustancias.

La frecuencia de inducción de sectores mutantes se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$f = \frac{(n \times 10^{-5})}{NC}$$

Donde:

f = frecuencia de inducción de sectores por célula; n = número de manchas; N = número de alas analizadas; C = número de células por ala.

Se ha considerado que cada ala analizada tiene aproximadamente unas 24.400 células (Alonso-Moraga y Graf, 1989).

4. Resultados

4.1 Características analíticas de las muestras

4.1.1 Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora

Las muestras de lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora, fueron tomados entre junio y diciembre del 2008 y 2009. El valor del pH osciló entre 5,66 y 6,21 y la conductividad eléctrica entre 4,5 y 5,3 dS m⁻¹.

4.1.2 Suelos agrícolas

La tabla 4.1 muestra la caracterización analítica de la muestra de suelo obtenida en la granja experimental “La Higuera”. Se distingue un pH ligeramente ácido, una conductividad eléctrica baja.

Por otra parte, la concentración de nutrientes como el P y Ca son ligeramente bajos, mientras que el contenido de K es alto. Los niveles de Fe y Mn se consideran dentro del rango de suficiencia, mientras que los de Cu y Zn se encuentran en valores deficitarios para el cultivo (Cadahía y Lucena, 1998; López y Grau, 2004).

Tabla 4.1 Caracterización físico-química del suelo

Parámetro	Suelo Control
pH (H ₂ O)	6,4
CE (dS m ⁻¹)	0,1
Macroelementos asimilables (mg kg⁻¹)	
P	90
K	200
Ca	1320
Mg	150
Na	13
Metales pesados totales (mg kg⁻¹)	
Fe	5920
Mn	65
Cu	3
Zn	18
Cr	5
Pb	3
Ni	4
Cd	< 0.2

Resultados

En resumen, el nivel de fertilidad agrícola del suelo es bajo, estando sometido a procesos degradativos similares a otros suelos de la región mediterránea (Zalidis et al., 2002) y que repercuten negativamente sobre sus funciones ecológicas dentro del agroecosistema.

4.1.3 Enmiendas agrícolas: lodo seco térmicamente, lodo compostado y compost de RSU

Las características analíticas de las enmiendas se muestran en la tabla 4.2. Se observa que el pH del compost de RSU es ligeramente más alcalino frente al lodo seco térmicamente (L) y el lodo compostado (LC), que se mantienen más cercanos a la neutralidad. De igual forma, la conductividad eléctrica en el compost de RSU es más elevada, sin duda por tratarse de un material fresco, frente a las otras dos enmiendas.

Tabla 4.2. Caracterización físico química enmiendas

Parámetro	L	RSU	LC
pH (H ₂ O)	7	6,34	7,15
CE (dS m ⁻¹)	2,3	10,8	7,8
Macroelementos asimilables (mg kg⁻¹)			
P	32000	5200	22100
K	4600	8000	6500
Ca	37400	57900	93200
Mg	11200	4800	9700
S	9100	5400	13800
Na	600	4900	1000
Metales pesados totales (mg kg⁻¹)			
Fe	45320	8064,8	30333
Mn	258	142,9	522
Cu	331	83	329
Zn	1202	290,9	1771
Cr	91	211,7	338
Pb	262	76,7	304
Ni	44	74,3	64
Cd	4,4	1	3,6
Al	20	8,2	41

Los valores medios de macroelementos se encuentran dentro de los rangos de valores encontrados en estos tipos de materiales orgánicos por otros autores (Fernández y col., 2009a; Mosquera-Losada y col., 2010).

Los valores totales de “metales pesados” presentes en los lodos constituyen uno de los factores limitantes de su aplicación agronómica. En nuestro caso, los contenidos en “metales pesados” se encuentran por debajo de los límites indicados en el Real Decreto 1310/1990, por el que se regula la aplicación de lodos de depuradora en el sector agrario, siendo materiales aptos para su uso en agricultura.

4.1.4 Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético

Las características analíticas de los lodos destinados a valorización energética se reflejan en la tabla 4.3. Se observa que el pH del lodo de origen industrial Madrid es más alcalino que el de origen urbano Valladolid. La conductividad eléctrica de ambos lodos es similar.

Los valores totales de “metales pesados” presentes en los lodos se encuentran por debajo de los límites indicados en el Real Decreto 1310/1990, por el que se regula la aplicación de lodos de depuradora en el sector agrario, por lo tanto también son materiales aptos para uso en agrícola.

Tabla 4.3. Caracterización físico-química de lodos Madrid y Valladolid

Parámetro	Lodo Madrid	Lodo Valladolid
pH (H ₂ O)	6,69	7,63
CE (dS m ⁻¹)	1,7	1,4
Macroelementos asimilables (mg)		
P	10866,8	14068,6
K	4225,5	6693,5
Ca	33136,0	31960,5
Mg	7822,9	6341,4
Na	718,3	760,1
Metales pesados totales (mg kg⁻¹)		
Fe	11,348	20711,0
Mn	121,5	150,3
Cu	260,8	150,2
Zn	940,4	1526,7
Cr	33,1	35,5
Pb	100,8	43,7
Ni	31,1	88,8
Cd	1,7	0

4.1.5 Mezclas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora

Resultados

La tabla 4.4, refleja la caracterización química de líquidos de pirólisis obtenidos a partir de los lodos de las estaciones depuradoras de aguas residuales industriales Madrid y urbanas Valladolid. Se puede observar que están conformados principalmente por 9 familias químicas. El detalle de la caracterización de cada uno de los líquidos se halla en los anexos 1, 2, 3, 4, 5 y 6..

En la figura 4.1 se puede distinguir que los compuestos pertenecientes al grupo de los aromáticos incrementan proporcionalmente con la temperatura de pirólisis, mientras que los grupos alifáticos y esteroides sufren una disminución. Respecto a los halogenuros y los aromáticos sulfurados no se observan cambios significativos.

Tabla 4.4 Grupos químicos (%) presentes en los líquidos de pirólisis Madrid y Valladolid

Grupo	Madrid			Valladolid		
	450°C	530°C	650°C	450°C	530°C	650°C
Alifáticos	15.69	25.15	7.43	16.76	14.30	2.62
Aromáticos	14.01	14.36	19.48	8.38	15.17	18.13
Poliaromáticos	1.23	9.11	24.65	2.26	11.44	36.99
Alifáticos oxigenados	18.34	7.79	0.07	16.33	13.19	1.12
Aromáticos oxigenados	11.82	7.57	21.33	1.72	4.71	2.17
Alifáticos nitrogenados	7.92	11.49	0.65	7.49	11.37	0.31
Aromáticos nitrogenados	17.67	4.81	26.07	30.95	23.52	36.37
Esteroides	12.01	15.23	0.32	13.94	2.29	0.00
Halogenuros	0.00	3.68	0.00	2.18	1.97	1.98
Aromáticos sulfurados	1.29	0.82	0.00	0.00	2.05	0.00

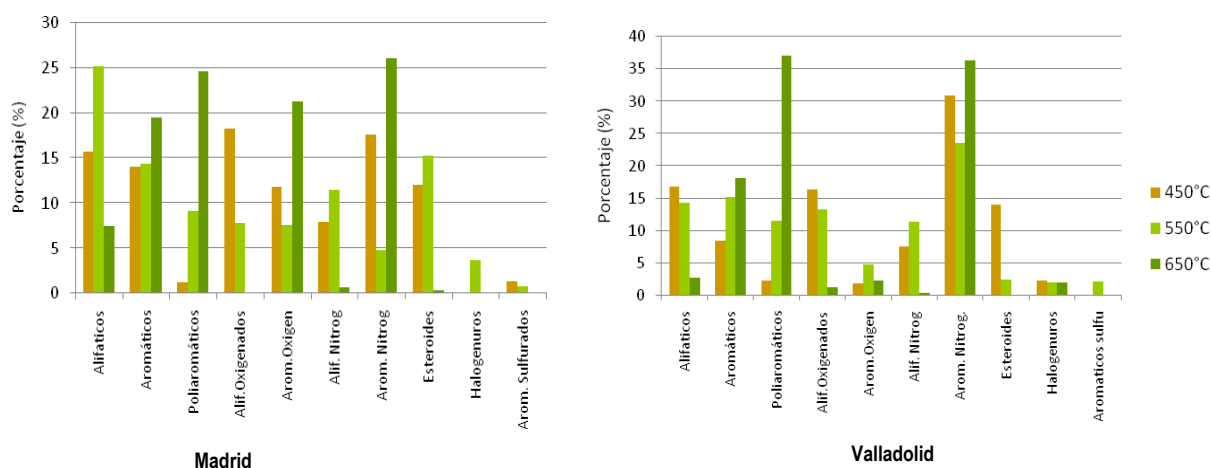


Figura 4.1. Caracterización química de líquidos de pirólisis

4.2 Ensayos biológicos

4.2.1 Ensayo de germinación en semilla de *Lepidium sativum*

4.2.1.1 Lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora

Las muestras de lixiviados fueron evaluadas al 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v). La tabla 4.5 y la figura 4.2 indican el valor del índice de germinación calculado para el tratamiento al 100% (v/v), se puede observar que los valores obtenidos son superiores al 80%, límite superior al cual no se evidencia fitotoxicidad (Zucconi y col., 1981). La tabla muestra además, la longitud promedio de la radícula y del hipocótilo, en ambos casos se determinó que no existe diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$).

Los valores del índice de germinación y la longitud media de radícula e hipocótilo producido por los tratamientos al 50, 25 y 10% (ver anexo 7) tampoco difirieron significativamente del control y en todos los casos el índice de germinación fue superior al 80%, por lo que no se evidencia un efecto fitotóxico producido por los lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora sobre la germinación de *Lepidium sativum*.

Tabla 4.5. Índice de germinación (IG), longitud media de la radícula (LR) e hipocótilo (LH) para las muestras de lixiviados (100% v/v), usando semillas de <i>Lepidium sativum</i> como indicador.									
		Control	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
2008	IG (%)	100	89,01	90,33	89,53	87,31	86,04	87,25	91,00
	LR(mm)	4,32	4,00	3,90	4,20	4,80	4,20	4,00	4,00
	LH(mm)	1,68	1,76	1,72	1,65	1,70	1,76	1,70	1,63
2009	IG (%)	100	87,59	86,52	92,49	91,41	91,94	95,94	92,61
	LR(mm)	4,05	4,22	4,32	4,00	4,00	4,10	3,90	3,70
	LH(mm)	1,64	1,66	1,56	1,58	1,67	1,60	1,72	1,72

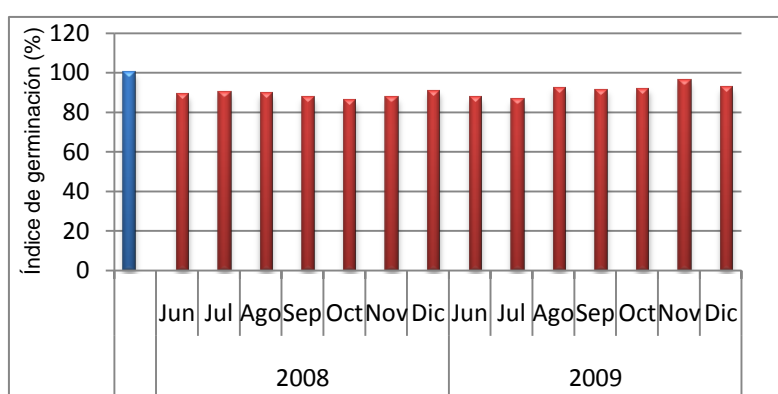


Figura 4.2. Efecto de la adición de lixiviados obtenidos en suelos enmendados con lodos de depuradora, con dosis de 0 (barra azul) y 100% (v/v) (barras rojas), sobre el índice de germinación de semillas de *L. sativum*.

Resultados

Se han evaluado concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v) de extractos acuosos y diclorometánicos de suelos que fueron enmendados con lodo secado térmicamente, compost de RSU y lodo compostado.

En general se pudo observar un efecto beneficioso de la adición de residuos al suelo agrícola. En la figura 4.3 se presentan los índices de germinación para los diferentes tratamientos. Se puede observar que en todos los casos el índice de germinación es superior al 80% respecto al 100% del control, lo que indicaría la ausencia de un efecto fitotóxico (Zucony y col, 1981). Sin embargo también se puede apreciar que el índice de germinación disminuye cuando las semillas de *L. sativum* son expuestas a extractos de suelos sin enmienda, lo que indica que la aplicación de residuos favorece el proceso de germinación.

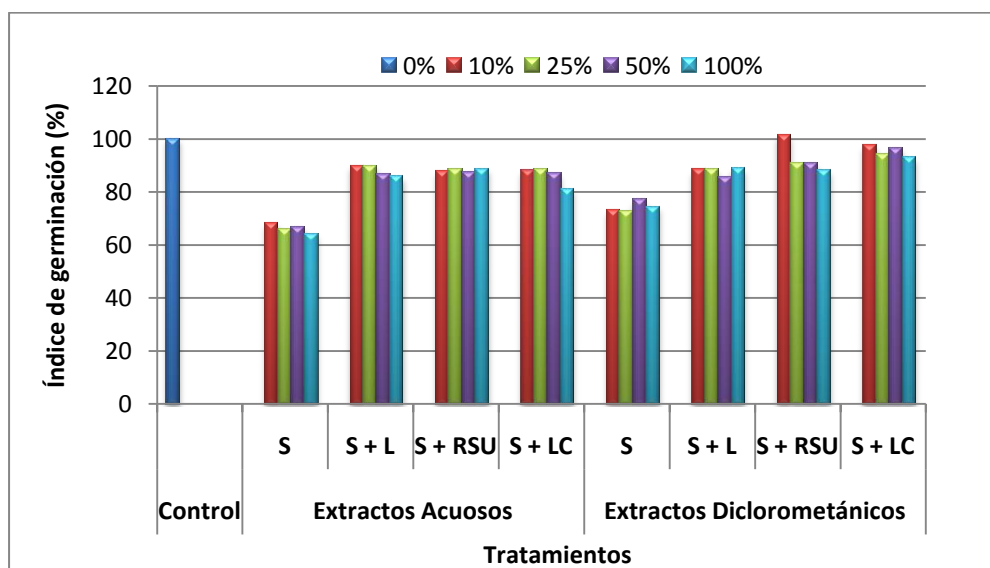


Figura 4.3. Efecto de la adición de extractos de suelos enmendados (S = suelo sin enmendar, S+L = suelo enmendado con lodo secado térmicamente, S+RSU = suelo enmendado con compost de RSU, S+LC = Suelo enmendado con lodo compostado, con dosis de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v) sobre el índice de germinación de semillas de *L. sativum*.

La figura 4.4 muestra las longitudes medias de las radículas e hipocótilos para todos los tratamientos. Respecto a los hipocótilos, se puede apreciar que ninguno de los tratamientos difiere estadísticamente del control ($p < 0,05$) y tampoco difieren entre tratamientos. Sin embargo analizando la longitud de la radícula, se puede observar que

los extractos de suelos no enmendados producen una disminución significativa de la longitud respecto al control y a los demás tratamientos.

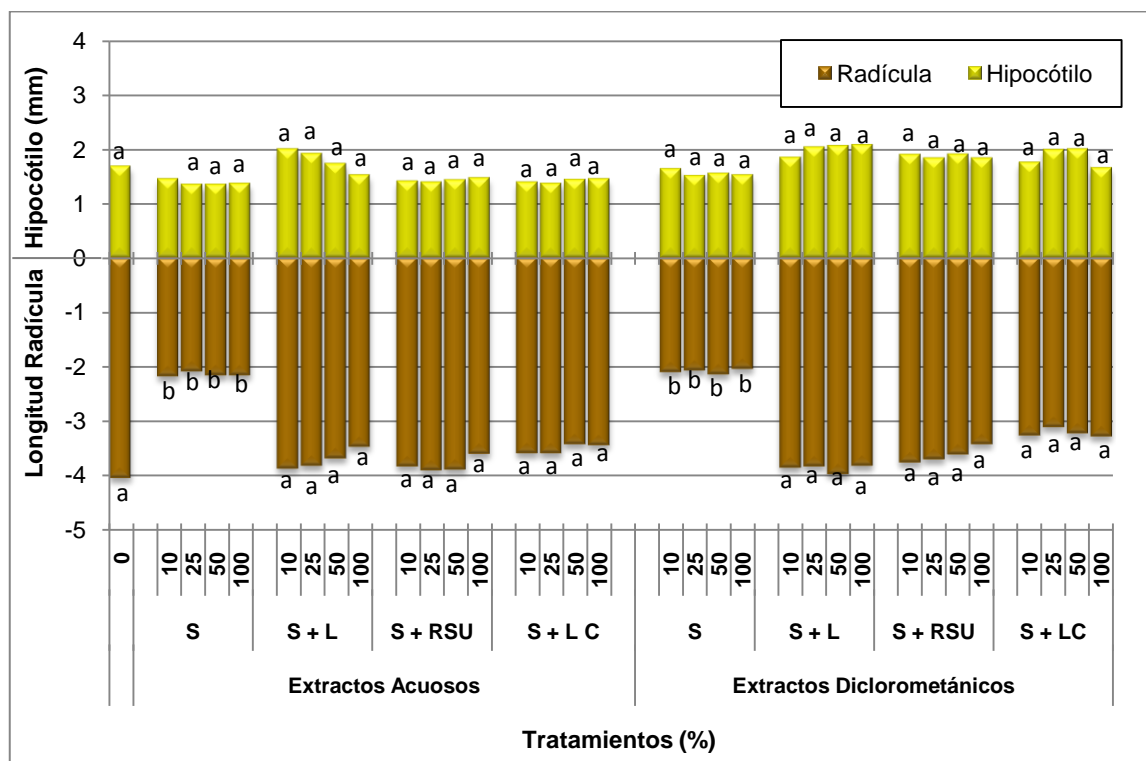


Figura 4.4. Efecto de la adición de extractos de suelos enmendados con residuos (S = suelo sin enmendar, S+L = Suelo enmendado con lodo de depuradora, S+RSU = suelo enmendado con compost de RSU, S+LC = Suelo enmendado con lodo compostado, con dosis de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v), sobre la longitud del hipocótilo y la radícula en semillas de *L. sativum*. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

4.2.1.3 Enmiendas agrícolas: lodo, lodo compostado y compost de RSU

Se han evaluado concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v) de extractos acuáticos y diclorometánicos de tres enmiendas agrícolas: lodo seco térmicamente, compost de RSU y lodo compostado.

La figura 4.5 muestra los índices de germinación para los extractos acuáticos y diclorometánicos, considerando que para el control este índice corresponde al 100%. La figura 4.6 indica la longitud media de la radícula e hipocótilo para ambos grupos de tratamientos.

Resultados

De acuerdo a los resultados, los extractos acuosos proporcionan un medio más adecuado para la germinación que los extractos diclorometánicos. El índice de germinación para los extractos acuosos fue superior al 60%.

Los valores de los índices de germinación para los extractos diclorometánicos de lodo y lodo compostado se encuentran por debajo del 60%, límite de fitotoxicidad propuestos por Zucconi y col. (1981), sin embargo en el caso del compost se observa que conforme disminuye la dosis de exposición se ve favorecido el proceso de germinación.

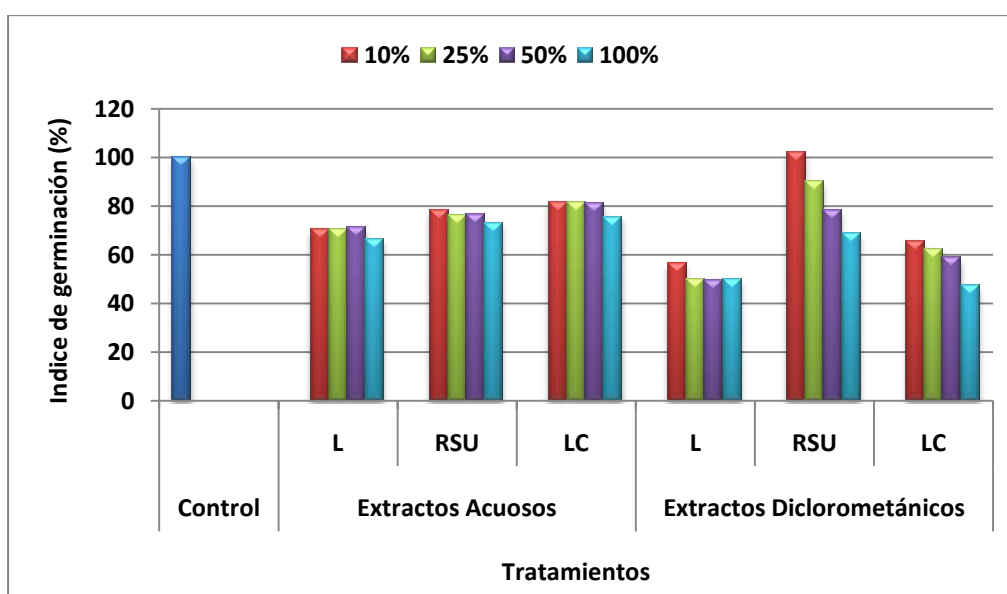


Figura 4.5. Efecto de la adición de extractos de residuos utilizados para enmendar suelos agrícolas (L = lodo secado térmicamente, RSU = compost de residuos urbanos, LC = lodo compostado), con dosis de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v) sobre el índice de germinación de semillas de *L. sativum*.

La figura 4.6 muestra los resultados de la longitud de la radícula y el hipocótilo. Se observa que las longitudes de radícula de los extractos acuosos y diclorometánicos no difieren significativamente del control ($p < 0,05$) y tampoco difieren significativamente entre sí. Sin embargo los extractos diclorometánicos inhiben significativamente el desarrollo de la radícula, excepto las dosis más bajas de compost (10% y 25%), cuyas longitudes son similares a las obtenidas con los tratamientos de extractos acuosos.

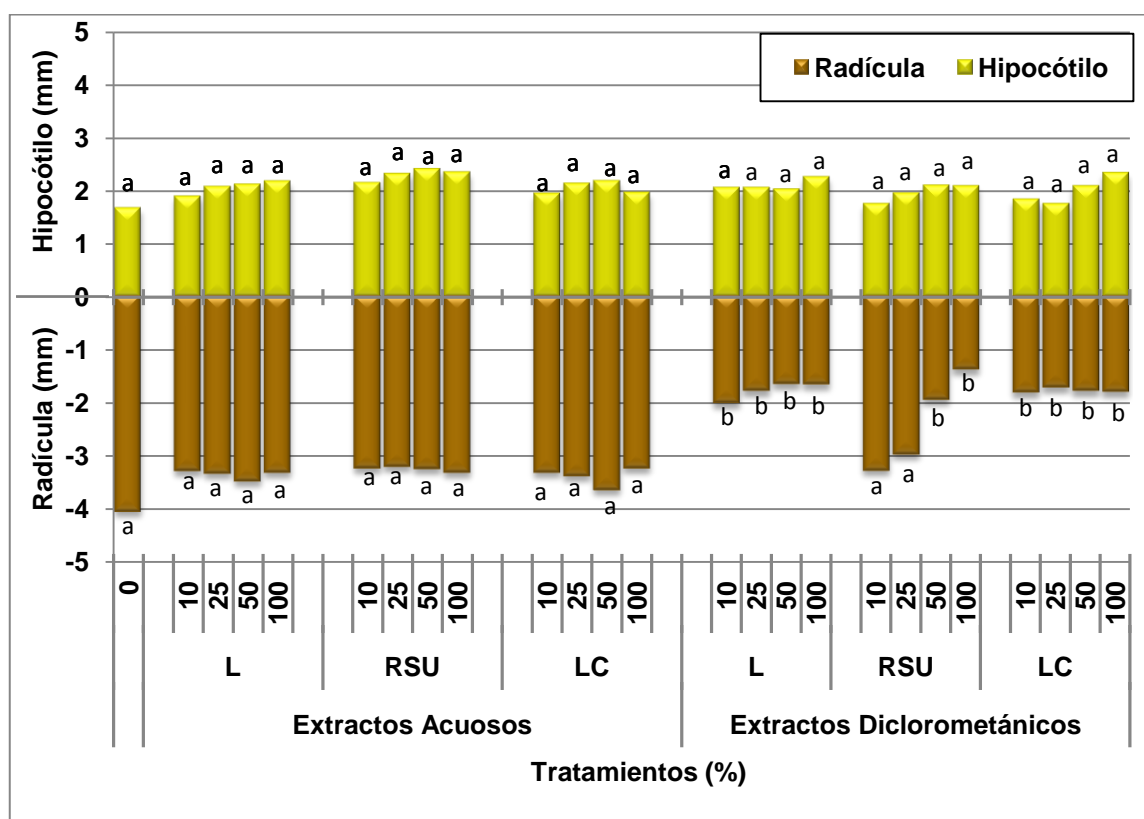


Figura 4.6. Efecto de la adición de distintos residuos que se emplean como enmiendas agrícolas (L = lodo secado térmicamente, RSU = Compost de residuos urbanos, LC = lodo compostado), con dosis de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v), sobre la longitud del hipocótilo y la radícula en semillas de *L. sativum* con los distintos tratamientos aplicados. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

4.2.1.4 Mezclas empleadas como materia prima para la obtención de productos energéticos

Se han evaluado concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v) de extractos acuáticos y diclorometánicos de lodos procedentes de dos estaciones depuradoras, una de origen industrial Madrid y otra de origen urbano Valladolid, que actualmente están siendo utilizados para la valorización energética mediante procesos de pirólisis.

La figura 4.7 muestra los resultados del índice de germinación para extractos acuáticos y diclorometánicos. En todos los casos se observa que el índice de germinación va incrementando conforme disminuye la dosis de exposición, sin embargo en ningún tratamiento se alcanza por lo menos el 50% de germinación respecto al 100% del control,

Resultados

esto indica que las diferentes dosis de los extractos ejercen un efecto fitotóxico elevado sobre la germinación de *L. sativum* (Zucconi y col., 1981).

La figura 4.8 muestra las longitudes medias de las radículas e hipocótilos para todos los tratamientos. Se observa que la longitud de los hipocótilos no difieren estadísticamente del control ($p < 0,05$), excepto en los tratamientos con las dosis más elevadas.

Respecto a la longitud de la radícula se puede distinguir que los diferentes tratamientos ejercen un efecto de inhibición significativa, por lo que se distingue una longitud menor respecto al control.

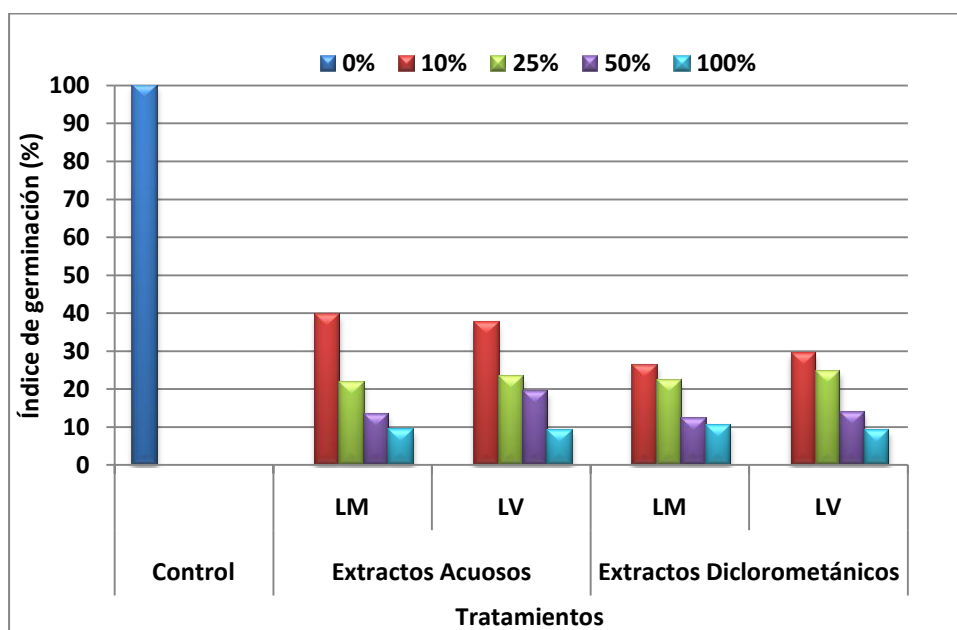


Figura 4.7. Efecto de la adición de extractos de lodos destinados a valorización energética (LM = lodo obtenido de una estación de depuración de Madrid, LV = lodo obtenido de una estación de depuración de Valladolid), con dosis de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v) sobre el índice de germinación de semillas de *L. sativum*.

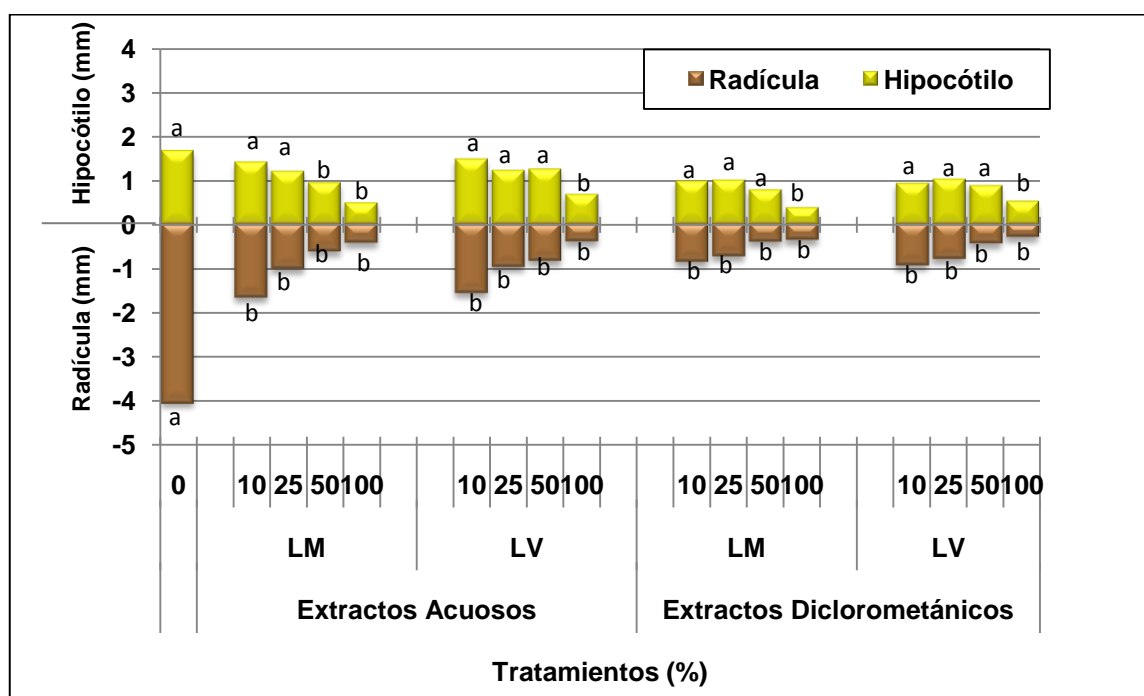


Figura 4.8. Efecto de la adición de extractos de lodos (LM = lodo de origen industrial Madrid, LV = lodo de origen urbano Valladolid), con dosis de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v), sobre la longitud del hipocótilo y la radícula en semillas de *L. sativum*. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($p < 0,05$).

4.2.1.5 Mezclas obtenidas de la valorización de lodos (líquidos de pirólisis)

Los lodos de las estaciones de depuración de aguas residuales de Madrid y Valladolid, fueron sometidos a procesos de pirólisis de 450, 530 y 650 °C. Por lo que para cada lodo se obtuvieron 3 líquidos de pirólisis.

Se evaluaron dosis de 0, 0.05, 0.1, 0.5 y 1% (v/v) de los líquidos de pirólisis Madrid y Valladolid.

En la Figura 4.9 se presentan los resultados del índice de germinación. La dosis máxima de los líquidos de pirólisis obtenidos a 530 y 650 °C ha resultado ser letal. En todos los casos, se puede apreciar que existe un incremento de la germinación conforme disminuye la dosis de exposición, sin embargo en ninguno se supera el 50% de germinación, lo que indica que estos líquidos ejercen un efecto fitotóxico significativo sobre *L. sativum* (Zucconi y col., 1981).

Resultados

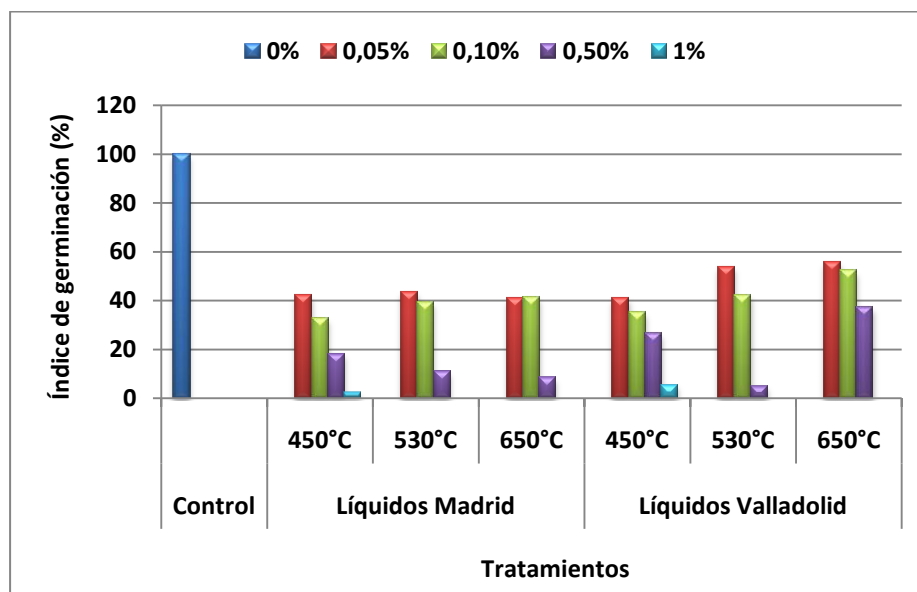


Figura 4.9. Efecto de la adición de líquidos de pirólisis de lodos de depuradora, obtenidos a diferentes temperaturas, con dosis de 0, 0,05, 0,01, 0,5 y 1% (v/v) sobre el índice de germinación de semillas de *L. sativum*.

En la Figura 4.10 se presentan los resultados del crecimiento de la radícula y el hipocótilo. Se puede ver que la aplicación de líquidos de pirólisis produce un efecto significativamente adverso en el crecimiento de ambos indicadores hasta el punto en que se inhibe completamente el desarrollo de radícula e hipocótilo.

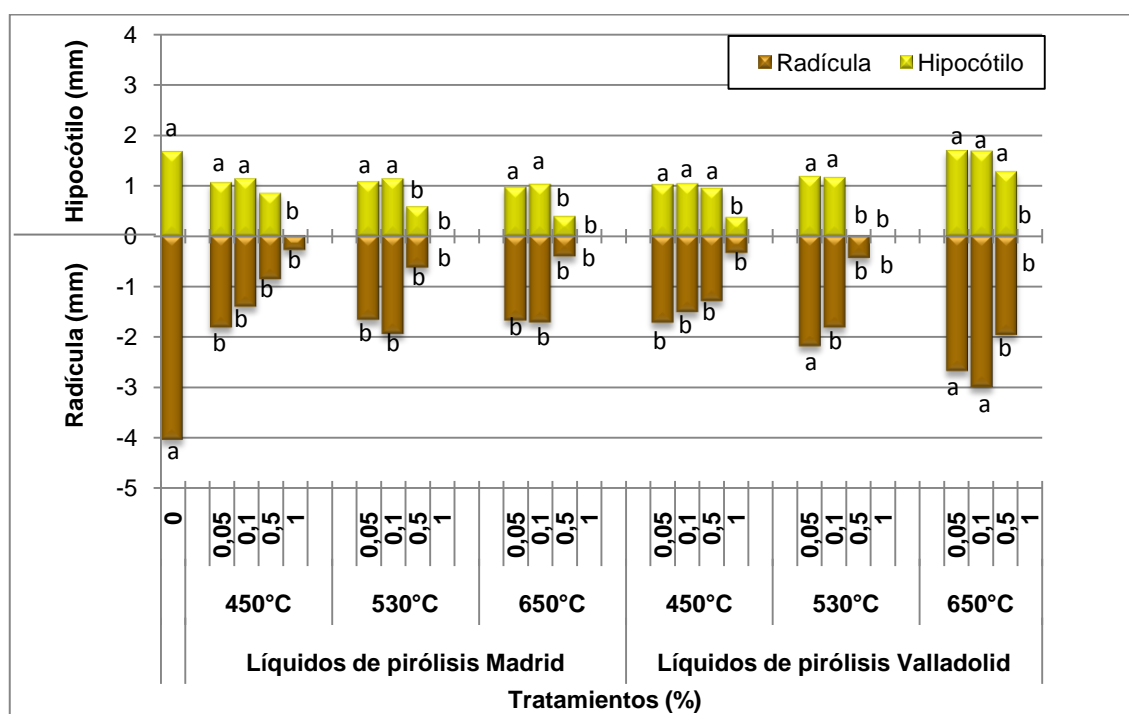


Figura 4.10. Efecto de la adición de líquidos de pirólisis de lodos de depuradora, obtenidos a diferentes temperaturas, con dosis de 0, 0.05, 0.01, 0.5 y 1% (v/v), sobre la longitud del hipocótilo y la radícula en semillas de *L. sativum*. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente ($p <$

4.2.2 Ensayo de inhibición de luminiscencia en *Vibrio fischeri*

Antes de realizar la evaluación mediante el ensayo de inhibición de la luminiscencia, ha sido necesario realizar ajustes de pH y conductividad de todas las muestras. Los valores iniciales y finales se muestran en el anexo 8.

4.2.2.1 Lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora

Las muestras de lixiviados fueron evaluadas al 6.25, 8.33, 12.50, 16.67, 25.00, 33.33, 50.00, 80.00% (v/v). La figura 4.11 muestra los resultados obtenidos para la muestra colectada en diciembre del 2009, se puede observar que ninguna de las dosis evaluadas ejerce un efecto de inhibición sobre la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*.

Los resultados obtenidos con las 13 muestras restantes (junio – diciembre 2008 y junio – noviembre 2009) han demostrado ejercer un efecto similar al producido por la muestra de lixiviado de diciembre del 2009, por lo que no se evidencia un efecto ecotóxico producido

Resultados

por los lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora sobre la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*.

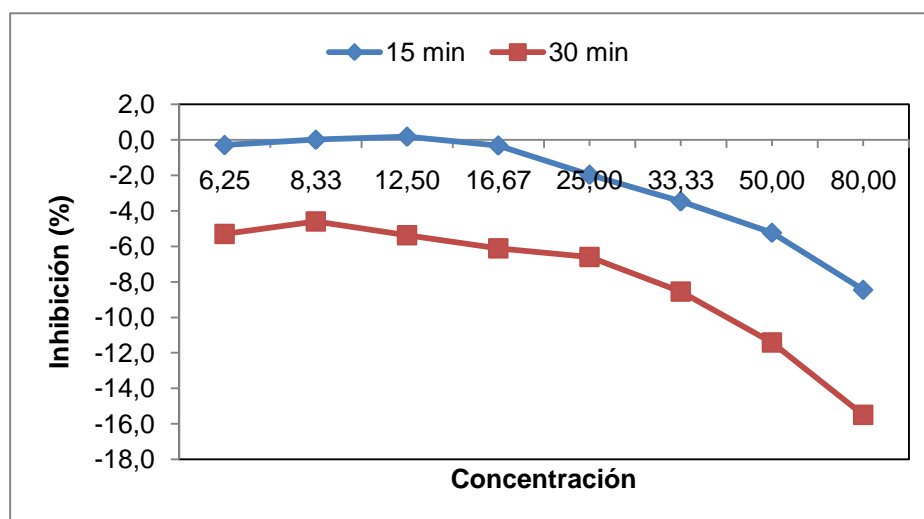


Figura 4.11. Efecto de la adición de lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora, con dosis de 6.25, 8.33, 12.50, 16.67, 25.00, 33.33, 50.00, 80.00% (v/v) sobre la emisión de bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* (Inhibición %), a los 15 y 30 minutos de exposición.

4.2.2.2 Suelos enmendados con lodo, lodo compostado y compost RSU

Se han evaluado concentraciones de 6.25, 8.33, 12.50, 16.67, 25.00, 33.33, 50.00, 80.00% (v/v) de extractos acuosos y diclorometánicos de suelos que fueron enmendados con: lodo secado térmicamente, compost de RSU y lodo compostado.

En la figura 4.12, se puede observar que los extractos acuosos de los diferentes tratamientos ejercen un efecto que favorece la emisión de unidades relativas de luz producidas por *Vibrio fischeri*. Los extractos diclorometánicos de los suelos enmendados también han demostrado ser medios adecuados que promueven la producción de bioluminiscencia.

En general no se evidencian diferencias significativas entre extractos acuosos y diclorometánicos, excepto en la muestra de suelo enmendado con compost de residuos urbanos, donde se puede apreciar que el porcentaje de inhibición de la luminiscencia va incrementado conforme incrementa la dosis de exposición, hasta alcanzar el 38% de inhibición a los 30 minutos de exposición.

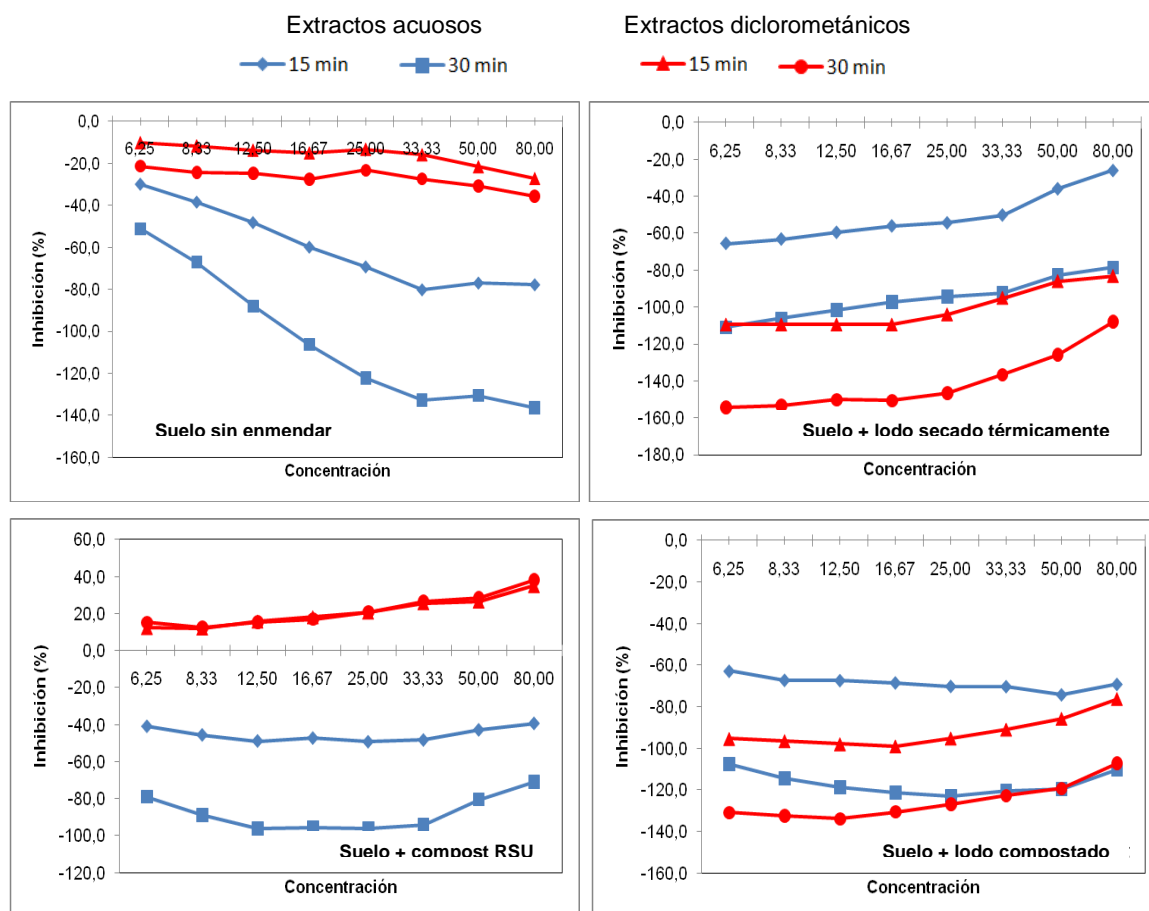


Figura 4.12. Efecto de la adición de extractos de suelos enmendados con residuos orgánicos (Lodo secado térmicamente, compost de RSU, lodo compostado), con dosis de 6.25, 8.33, 12.50, 16.67, 25.00, 33.33, 50.00, 80.00% (v/v) sobre la emisión de bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* (Inhibición %), a los 15 y 30 minutos de exposición.

4.2.2.3 Enmiendas agrícolas: lodo, lodo compostado y compost de RSU

Se han evaluado concentraciones de 6.25, 8.33, 12.50, 16.67, 25.00, 33.33, 50.00, 80.00% (v/v) de extractos acuosos y diclorometánicos de tres tipos de enmiendas: lodo secado térmicamente, compost de RSU y lodo compostado.

La figura 4.13 muestra la inhibición de la bioluminiscencia (%) observada a los 15 y 30 minutos para los diferentes tratamientos. Se puede apreciar que tanto extractos acuosos como diclorometánicos proporcionan un medio adecuado para *Vibrio fischeri*, lo cual se ve reflejado por un incremento de la intensidad lumínica conforme menor es la dosis de exposición. Sin embargo para las concentraciones más altas del tratamiento con lodo

Resultados

compostado, donde se puede apreciar un efecto de inhibición de la bioluminiscencia, pero este es inferior al 50%.

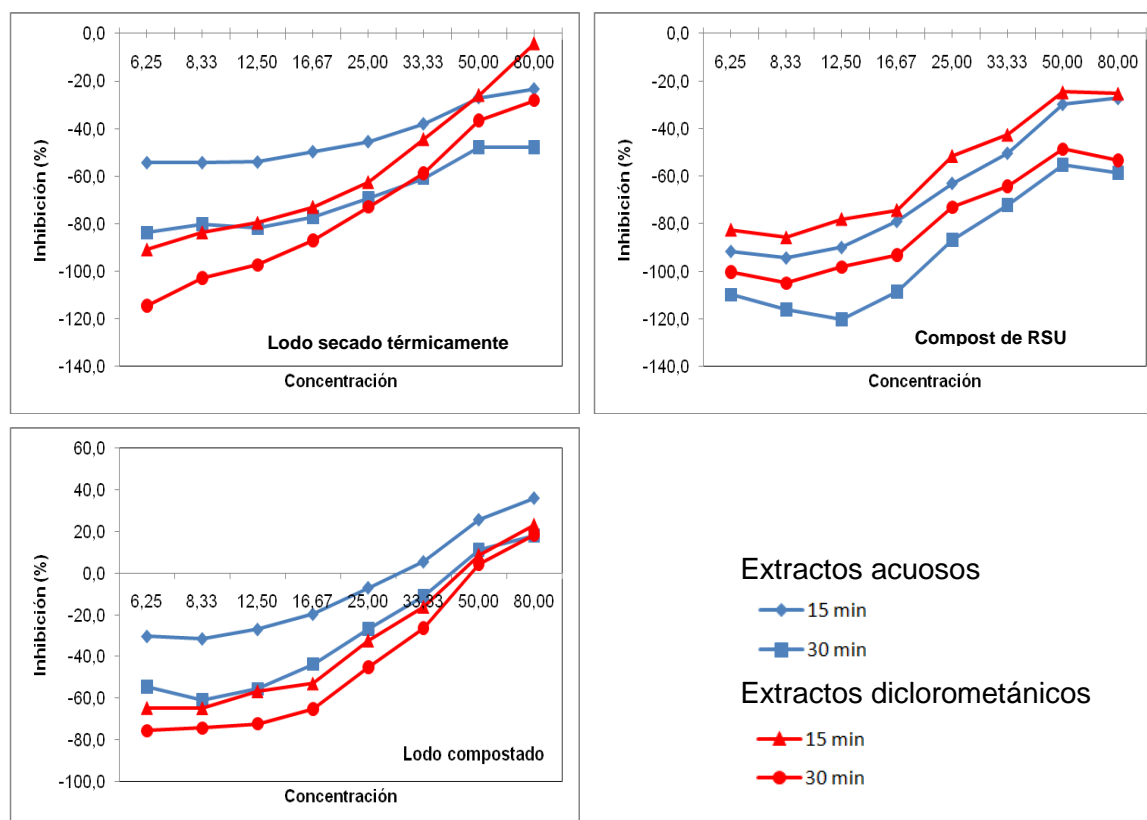


Figura 4.13. Efecto de la adición de extractos de enmiendas de suelos agrícolas (Lodo secado térmicamente, compost de RSU, lodo compostado), con dosis de 6.25, 8.33, 12.50, 16.67, 25.00, 33.33, 50.00, 80.00% (v/v) sobre la emisión de bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* (Inhibición %), a los 15 y 30 minutos de exposición.

También se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los extractos acuosos respecto a los diclorometánicos. Los residuos aplicados como enmiendas orgánicas han demostrado que no ejercen un efecto tóxico sobre *Vibrio fischeri*.

4.2.2.4 Mezclas empleadas como materia prima para la obtención de productos energéticos

Dada la toxicidad y turbidez de los extractos de ambos lodos (Madrid y Valladolid) fueron necesarios experimentos previos para obtener el rango de dosis a partir de cual se

puedan realizar las evaluaciones. Se han definido como dosis de evaluación: 1.25, 1.67, 2.50, 3.33, 5.00, 6.67, 10.00, y 16.00 % (v/v).

En la figura 4.14 se puede observar que los extractos del lodo Valladolid proporcionan un medio adecuado para la producción de luminiscencia de *Vibrio fischeri*. Sin embargo los resultados por exposición a los extractos del lodo Madrid, muestran que las dosis más altas ejercen un efecto de inhibición de la luminiscencia.

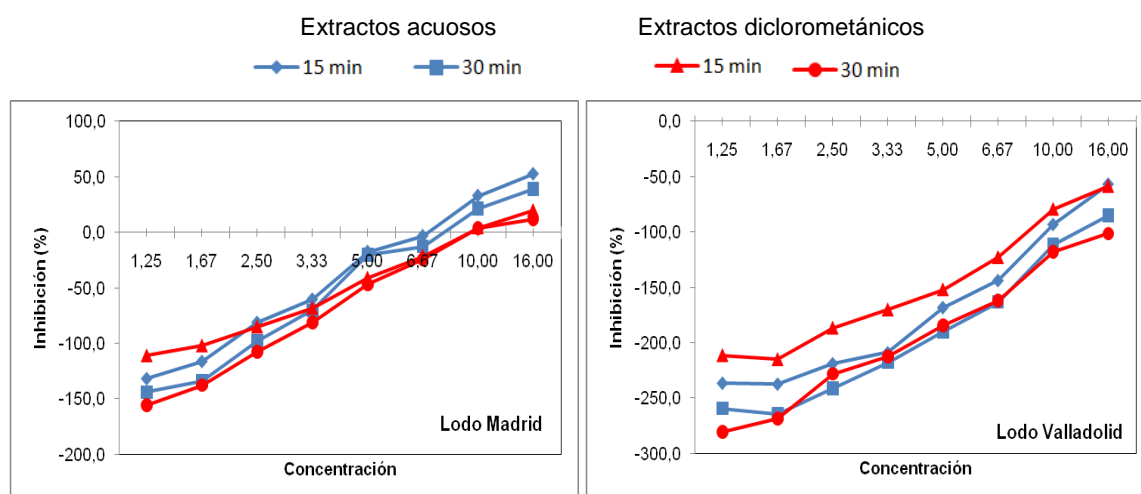


Figura 4.14. Efecto de la adición de extractos de lodos utilizados como materia prima para la valorización energética, con dosis de 6.25, 8.33, 12.50, 16.67, 25.00, 33.33, 50.00, 80.00% (v/v) sobre la emisión de bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* (Inhibición %), a los 15 y 30 minutos de exposición.

Específicamente, la concentración más alta del extracto acuoso (16% v/v), llega a inhibir el 52% de luminosidad cuando el tiempo de exposición es de 15 minutos, pero dicho efecto disminuye cuando se alcanza los 30 minutos de exposición. En general no se han observado diferencias significativas entre extractos acuosos y diclorometánicos.

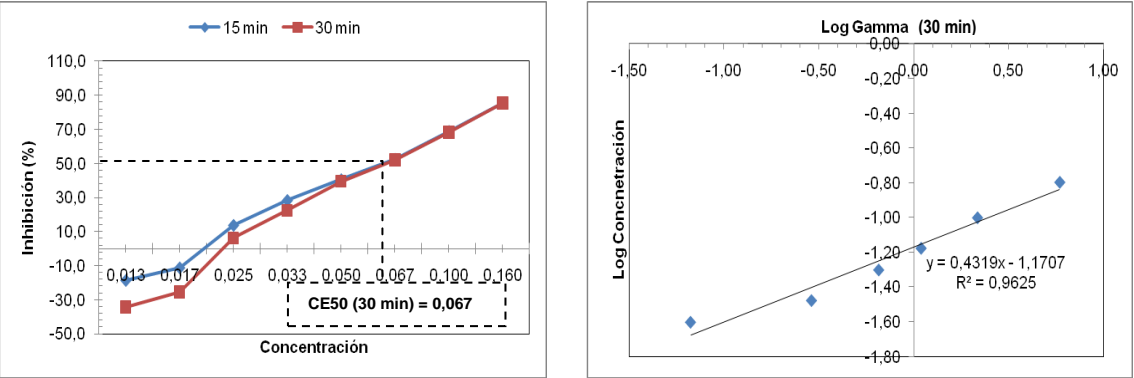
4.2.2.5 Mezclas obtenidas de la valorización de lodos (Líquidos de pirólisis)

Debido a la toxicidad de los líquidos de pirólisis Madrid y Valladolid de 450, 530 y 650 °C, fueron necesarios varios experimentos previos para obtener el rango de dosis a partir de cual se puedan realizar las evaluaciones. Se definieron como dosis de evaluación: 0.013, 0.017, 0.025, 0.033, 0.050, 0.067, 0.100 y 0.160 % (v/v).

En las figuras 4.15 y 4.16 se muestran los porcentajes de inhibición de la luminiscencia emitida por *Vibrio fischeri*, tras 15 y 30 minutos de exposición a las diferentes dosis de los

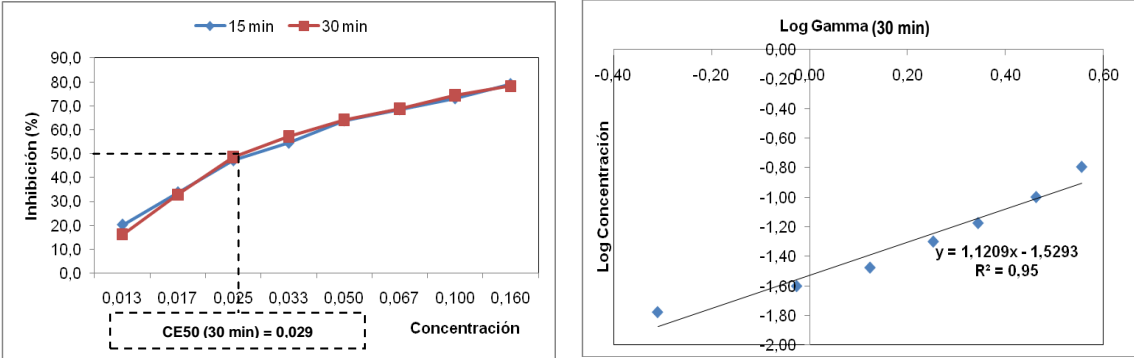
Resultados

a) Madrid 450°C



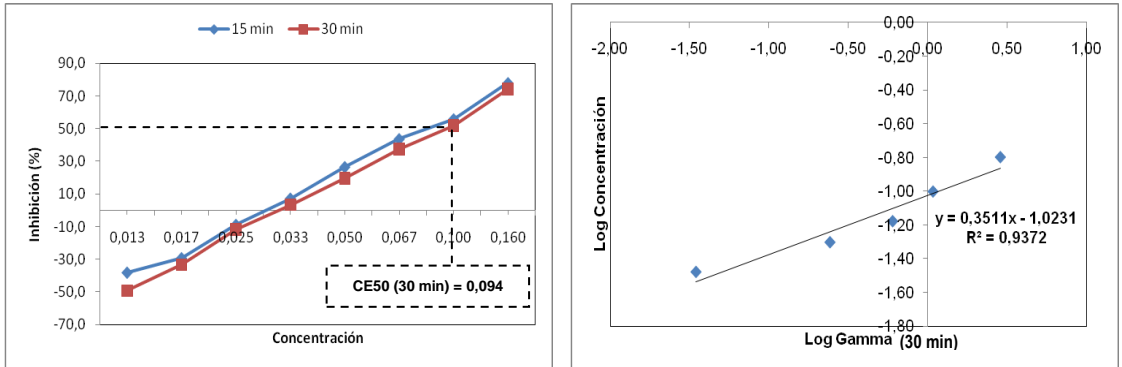
	CE50	Límite Inferior	Límite Superior
15 min	0.062 %	0.057 %	0.068 %
30 min	0.067 %	0.057 %	0.080 %

b)



	CE50	Límite Inferior	Límite Superior
15 min	0.030 %	0.025 %	0.035 %
30 min	0.029 %	0.023 %	0.037 %

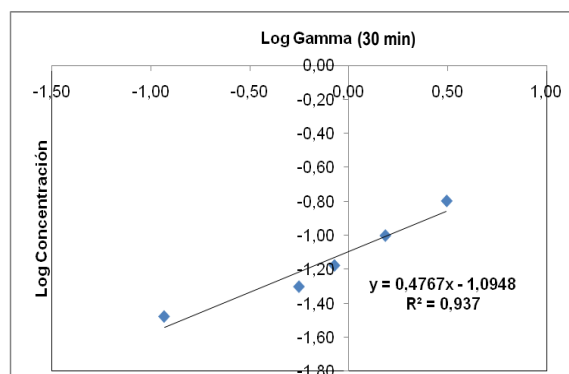
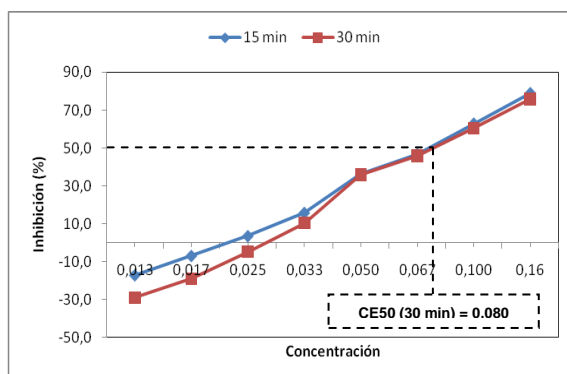
c) Madrid 650 °C



	CE50	Límite Inferior	Límite Superior
15 min	0.085 %	0.069 %	0.106 %
30 min	0.094 %	0.065 %	0.136 %

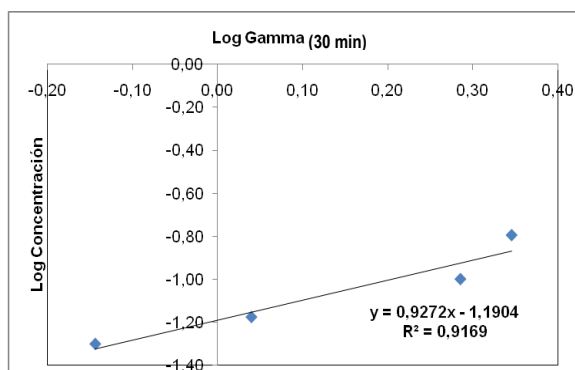
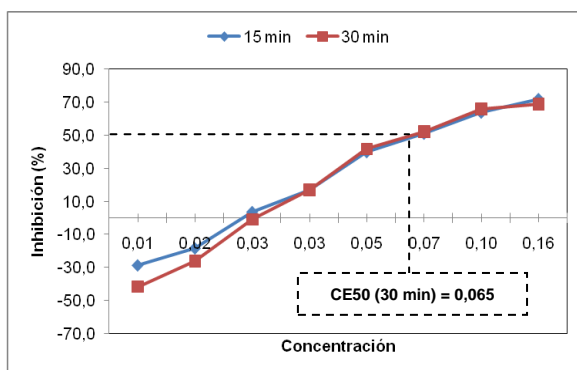
a) Valladolid 450 °C

Figura 4.15. Efecto de la adición de líquidos de pirólisis Madrid, con dosis de 0.013, 0.017, 0.025, 0.033, 0.050, 0.067, 0.100 y 0.160 % (v/v) sobre la emisión de bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* (Inhibición %), a los 15 y 30 minutos de exposición.



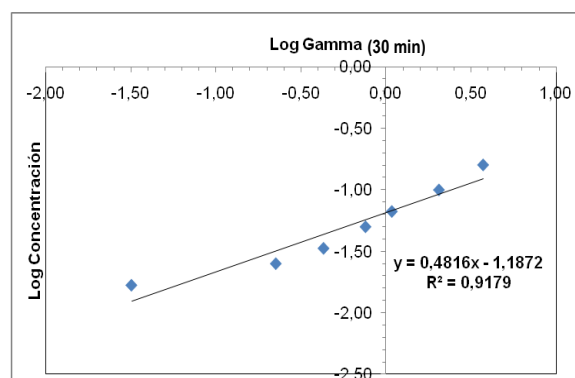
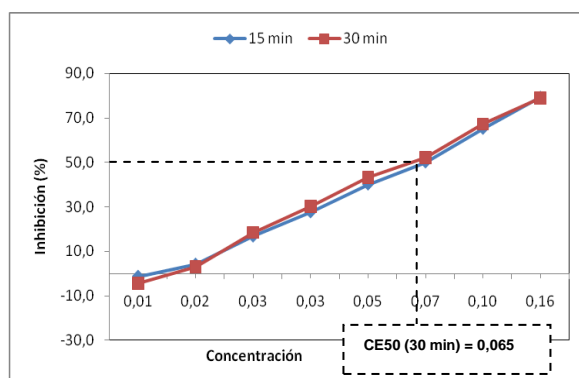
	CE50	Límite Inferior	Límite Superior
15 min	0,076 %	0,060%	0,098 %
30 min	0,080 %	0,062 %	0,104 %

b) Valladolid 530 °C



	CE50	Límite Inferior	Límite Superior
15 min	0,067 %	0,054%	0,084 %
30 min	0,065 %	0,041 %	0,102 %

c) Valladolid 550 °C



	CE50	Límite Inferior	Límite Superior
15 min	0,068 %	0,056 %	0,082 %
30 min	0,065 %	0,050 %	0,084 %

Figura 4.16. Efecto de la adición de líquidos de pirólisis Valladolid, con dosis de 0.013, 0.017, 0.025, 0.033, 0.050, 0.067, 0.100 y 0.160 % (v/v) sobre la emisión de bioluminiscencia de *Vibrio fischeri* (Inhibición %), a los 15 y 30 minutos de exposición.

Resultados

líquidos de pirólisis de Madrid y Valladolid. Las figuras muestran además los valores $\text{Log } \Gamma$ para la determinación de CE50 a los 30 min, así como los límites superior e inferior de los intervalos de confianza al 95%.

En todos los tratamientos se puede observar el porcentaje de inhibición de la luminiscencia tiene una relación directamente proporcional con las dosis de evaluación, es decir, que a mayor dosis de exposición mayor es el porcentaje de inhibición.

También se puede observar que en todos los casos no existen diferencias significativas entre los 15 y 30 minutos de exposición, lo que indicaría que a los 15 minutos la mayoría de las dosis ejercen su máximo nivel de inhibición de luminiscencia.

Los valores de CE50 para cada uno de los tratamientos fueron determinados mediante análisis de regresión lineal en el que se emplearon los valores *Gamma*, cuya determinación fue explicada en el apartado 3.3.2.4. A la vista de los resultados, se distingue que en todos los casos el valor de R^2 es superior al 90% (α 0,05), lo que indicaría una relación positiva entre dosis de exposición e inhibición de luminiscencia.

Para todos los casos el punto en el que la línea de tendencia corta con el eje Y se corresponde con el valor del CE50, valor que fue transformado y remplazado en las Figuras de inhibición de luminiscencia.

De acuerdo a los valores de CE50 a los 30 min, obtenidos para los líquidos de pirólisis de origen industrial Madrid, se determina que el grado de toxicidad es el siguiente: 530 °C (0,029) > 450 °C (0,067) > 650 °C (0,094) y para los líquidos de pirólisis de origen urbano Valladolid: 530 °C (0,065) = 650 °C (0,065) > 450 °C (0,080).

4.2.3 Ensayo de mutagenicidad en *Salmonella typhimurium*

4.2.3.1 Lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora

Las muestras de lixiviados fueron evaluadas al 0, 25, 50 y 100% (v/v) mediante el ensayo de incorporación en placa estándar, realizándose además las variantes con activación (+S9) y sin activación (-S9) metabólica. En la tabla 4.6 se presentan los valores promedio del número de revertientes y la desviación estándar que se obtuvieron al 100% de exposición.

Los resultados muestran que ninguno de los tratamientos tiene la capacidad de producir un incremento del número de revertientes respecto los observados en el control. Estos resultados son similares a los obtenidos con las dosis de 25 y 50% de exposición (Los datos se muestran en el anexo 9 y 10). Por lo tanto, los resultados evidencian que los lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora no tienen la capacidad de producir efectos mutagénicos sobre *Salmonella typhimurium*.

Tabla 4.6. Mutagenicidad de lixiviados de suelos enmendados con lodos. N° de revertientes (desviación estándar)

Tratamientos	-S9				+S9			
	TA98	TA100	TA102	TA104	TA98	TA100	TA102	TA104
Control	22 (0,58)	116 (1,15)	283 (1,00)	315 (2,52)	29 (0,58)	137 (1,00)	288 (1,00)	365 (2,52)
2008	Jun 23 (1,53)	118 (0,58)	285 (0,58)	315 (1,15)	29 (1,53)	138 (1,53)	288 (0,58)	366 (3,79)
	Jul 23 (1,15)	117 (1,15)	282 (0,58)	320 (1,53)	27 (4,04)	138 (1,15)	287 (2,31)	366 (1,73)
	Ago 23 (1,53)	117 (1,00)	284 (2,08)	316 (1,53)	28 (3,00)	137 (2,08)	288 (2,52)	366 (3,21)
	Sep 22 (1,53)	115 (0,58)	283 (2,08)	319 (1,53)	30 (1,53)	137 (0,58)	289 (2,65)	370 (0,58)
	Oct 22 (1,53)	117 (2,00)	285 (1,15)	320 (0,58)	28 (3,06)	137 (1,53)	289 (1,00)	364 (2,31)
	Nov 23 (1,53)	117 (2,00)	283 (2,08)	320 (1,15)	30 (2,31)	135 (1,73)	289 (1,00)	366 (2,08)
	Dic 22 (1,15)	117 (0,58)	285 (1,73)	319 (2,00)	26 (0,00)	136 (1,73)	289 (1,73)	366 (0,58)
2009	Jun 24 (1,53)	118 (1,53)	283 (0,58)	319 (1,73)	31 (1,15)	135 (1,00)	287 (1,53)	366 (0,58)
	Jul 23 (1,00)	116 (1,73)	282 (2,52)	317 (3,79)	30 (0,00)	138 (2,52)	290 (2,52)	366 (3,51)
	Ago 21 (0,00)	117 (2,08)	283 (1,73)	318 (3,21)	30 (1,15)	135 (0,58)	285 (0,58)	364 (1,53)
	Sep 23 (1,15)	116 (2,08)	282 (2,52)	317 (1,15)	31 (1,00)	138 (1,73)	287 (1,53)	369 (1,00)
	Oct 23 (1,53)	116 (2,00)	283 (2,00)	320 (1,00)	29 (0,00)	139 (1,15)	287 (2,08)	365 (1,15)
	Nov 23 (1,53)	116 (1,53)	284 (2,31)	317 (2,52)	30 (1,53)	138 (2,65)	287 (1,15)	365 (2,65)
	Dic 22 (0,58)	117 (3,00)	283 (1,15)	319 (2,08)	30 (1,53)	139 (1,53)	290 (3,21)	368 (2,08)
Mut.Estándar*	286 (3,06)	2.144 (69,54)	2.213 (12,77)	4.641 (2,65)	1.284 (4,51)	3.665 (5,31)	4657 (6,7)	5678 (6,34)

*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

Resultados

4.2.3.2 Suelos enmendados con lodo, lodo compostado y compost RSU

Muestras de suelos enmendados con lodo secado térmicamente, compost de RSU y lodo compostado fueron evaluados mediante el ensayo de incorporación en placa estándar a las dosis de 0, 25, 50 y 100% (v/v).

La tabla 4.7 muestra los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos. En general se pudo observar que el número de colonias revertientes no difiere significativamente del control. Por lo tanto, los extractos acuosos y diclorometánicos de suelos enmendados con residuos no tienen la capacidad de ejercer un efecto mutagénico sobre *Salmonella typhimurium*.

Tabla 4.7 Mutagenicidad de suelos enmendados con residuos: SL= suelo + lodo, SRSU= suelo + compost RSU, SLC= suelo + lodo compostado. N° de revertientes (desviación estándar)

Tratamientos (%)	-S9				+S9			
	TA98	TA100	TA102	TA104	TA98	TA100	TA102	TA104
0	22 (0,58)	116 (1,15)	283 (1,00)	315 (2,52)	29 (0,58)	137 (1,00)	288 (1,00)	365 (2,52)
SL	25 22 2,31	118 (1,15)	284 (3,00)	317 (4,73)	32 (0,58)	137 (0,58)	286 (1,00)	366 (3,00)
	50 22 2,08	116 (1,53)	283 (1,53)	316 (4,58)	32 (0,58)	139 (1,53)	287 (3,21)	366 (1,00)
	100 21 1,00	116 (2,08)	284 (2,65)	317 (4,73)	29 (2,08)	138 (1,73)	289 (0,58)	363 (0,58)
SRSU	25 23 1,73	115 (1,00)	281 (1,15)	318 (2,08)	1.284 (4,51)	137 (2,08)	287 (2,08)	363 (1,53)
	50 24 1,00	117 (1,53)	286 (1,00)	314 (2,31)	30 (1,00)	140 (1,73)	288 (2,08)	366 (3,00)
	100 22 1,73	118 (0,58)	284 (1,00)	316 (2,65)	29 (0,58)	138 (2,31)	287 (2,08)	365 (1,53)
SLC	25 24 0,58	116 (2,31)	283 (2,65)	318 (4,04)	29 (2,08)	139 (1,15)	287 (1,53)	368 (1,73)
	50 24 0,58	117 (2,08)	285 (2,08)	318 (3,79)	29 (2,52)	136 (0,58)	288 (2,52)	365 (3,51)
	100 23 2,08	118 (1,73)	285 (2,08)	319 (3,51)	29 (2,89)	137 (1,73)	287 (3,21)	364 (4,58)
0	21 (1,53)	117 (0,58)	283 (1,00)	315 (1,53)	30 (0,58)	138 (0,58)	289 (0,58)	364 (1,15)
SL	25 22 1,15	118 (2,08)	137 (2,00)	317 (3,06)	26 (1,73)	117 (1,53)	290 (1,15)	364 (3,51)
	50 23 2,52	117 (2,52)	137 (1,00)	315 (2,52)	29 (2,52)	117 (2,52)	289 (1,00)	366 (4,04)
	100 23 1,15	119 (0,58)	139 (3,21)	317 (3,51)	29 (2,00)	116 (1,00)	288 (3,51)	367 (4,16)
SRSU	25 23 1,53	119 (2,31)	281 (1,00)	317 (1,15)	28 (2,08)	136 (0,00)	289 (2,89)	365 (2,65)
	50 23 1,00	117 (1,73)	284 (3,46)	315 (3,00)	27 (3,21)	137 (1,00)	290 (1,73)	367 (1,73)
	100 21 2,31	118 (0,58)	285 (2,08)	314 (0,58)	27 (1,15)	137 (2,08)	291 (1,73)	365 (2,08)
SLC	25 24 1,00	119 (1,53)	284 (3,06)	317 (2,89)	28 (1,53)	137 (0,58)	287 (2,00)	364 (1,53)
	50 22 2,89	117 (2,65)	285 (2,08)	316 (4,00)	26 (2,31)	139 (2,00)	288 (2,89)	366 (3,51)
	100 23 2,08	118 (2,08)	286 (0,58)	315 (1,53)	27 (2,00)	138 (2,52)	288 (3,00)	367 (3,51)
Mut. estándar*	286 (3,06)	2.144 (69,54)	2.213 (12,77)	4.641 (2,65)	1.284 (4,51)	3.665 (5,31)	4657 (6,7)	5678 (6,34)

*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

4.2.3.3 Enmiendas agrícolas: lodo, lodo compostado y compost de RSU

Mediante el ensayo de incorporación en placa estándar con y sin activación metabólica, se han evaluado concentraciones de 0, 25, 50 y 100% (v/v) de extractos acuosos y diclorometánicos de lodo secado térmicamente, compost de RSU y lodo compostado.

La tabla 4.8 muestra los valores promedio del número de revertientes para cada uno de los tratamientos. Los resultados indican que ninguna de las enmiendas orgánicas evaluadas tiene la capacidad de producir un efecto mutagénico sobre *Salmonella typhimurium*, por lo que el número de colonias revertientes en ninguno de los casos difirió significativamente del control.

Tabla 4.8 Mutagenicidad de enmiendas: L=Lodo secado térmicamente, RSU=Compost RSU, LC=Lodo compostado. N° de revertientes (desviación estándar)

Tratamientos	-S9				+S9			
	TA98	TA100	TA102	TA104	TA98	TA100	TA102	TA104
0	22 (0,58)	116 (1,15)	283 (1,00)	315 (2,52)	29 (0,58)	137 (1,00)	288 (1,00)	365 (2,52)
L	25 24 (0,58)	116 (1,53)	283 (1,00)	316 (1,53)	29 (1,73)	138 (3,21)	287 (4,04)	365 (2,08)
	50 20 (0,58)	117 (2,08)	282 (2,08)	316 (3,21)	30 (2,65)	137 (3,46)	291 (0,58)	364 (2,89)
	100 22 (1,00)	118 (2,08)	285 (1,73)	317 (5,03)	30 (0,58)	138 (3,46)	286 (1,73)	368 (1,53)
	25 22 (1,53)	114 (1,53)	283 (2,65)	319 (1,73)	31 (1,73)	137 (2,89)	287 (1,73)	368 (2,31)
RSU	50 20 (1,53)	116 (3,06)	283 (1,00)	316 (0,58)	31 (2,65)	136 (1,53)	287 (2,08)	368 (1,15)
	100 21 (1,73)	117 (1,73)	283 (2,65)	318 (2,00)	28 (0,58)	138 (2,31)	288 (2,31)	365 (1,00)
	25 24 (1,15)	116 (1,00)	283 (0,58)	316 (1,73)	30 (1,73)	137 (2,65)	287 (3,21)	366 (2,08)
LC	50 24 (1,53)	117 (1,73)	286 (1,15)	318 (3,79)	29 (1,53)	141 (0,58)	289 (1,53)	366 (4,93)
	100 23 (1,00)	118 (1,53)	285 (3,46)	318 (3,61)	29 (2,89)	138 (2,52)	288 (1,53)	367 (2,52)
	0 21 (1,53)	117 (0,58)	283 (1,00)	315 (1,53)	30 (0,58)	138 (0,58)	289 (0,58)	364 (1,15)
L	25 21 (1,15)	116 (1,73)	285 (2,00)	316 (3,79)	30 (1,00)	137 (2,31)	289 (3,61)	368 (2,08)
	50 23 (2,00)	118 (2,65)	284 (3,61)	319 (1,15)	29 (2,00)	137 (2,00)	289 (1,53)	367 (2,65)
	100 21 (1,15)	115 (1,15)	283 (2,65)	316 (4,93)	30 (2,08)	138 (3,79)	288 (2,52)	365 (4,04)
	25 23 (1,73)	118 (1,53)	285 (2,31)	317 (1,15)	29 (1,73)	138 (0,58)	290 (2,31)	364 (3,46)
RSU	50 21 (1,15)	115 (0,58)	284 (2,31)	316 (2,89)	29 (1,53)	139 (2,08)	290 (1,15)	365 (1,53)
	100 21 (2,00)	115 (0,58)	284 (2,08)	318 (2,52)	29 (1,73)	138 (2,52)	289 (1,53)	364 (1,53)
	25 22 (2,52)	117 (1,00)	284 (2,52)	315 1,15	26 (1,15)	137 (3,46)	288 (2,89)	365 (4,00)
LC	50 24 (1,00)	117 (1,53)	285 (1,73)	319 2,08	28 (3,00)	137 (2,08)	289 (1,53)	367 (3,21)
	100 22 (0,58)	117 (2,65)	283 (2,52)	216 171,48	29 (2,08)	138 (1,15)	289 (2,65)	364 (4,16)
Mut. estándar*	286 (3,06)	2.144 (69,54)	2.213 (12,77)	4.641 (2,65)	1.284 (4,51)	3.665 (5,31)	4657 (6,7)	5678 (6,34)

*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

4.2.3.4 Mezclas empleadas como materia prima para la obtención de productos energéticos

La evaluación mutagénica de extractos acuosos y diclorometánicos de lodos procedentes de estaciones depuradoras de Madrid y Valladolid se ha llevado a cabo mediante el ensayo de incorporación en placa estándar. Las dosis evaluadas fueron 0, 25, 50 y 100% (v/v).

La tabla 4.9 muestra los valores promedio del número de revertientes observado en cada uno de los tratamientos, así como la desviación estándar y los índices de mutación. Los cálculos del índice de mutación fueron realizados de acuerdo a lo detallado en el apartado 3.3.3.8.

Se puede observar que para la cepa TA98 y TA100, con y sin S9, se produce un incremento del número de revertientes respecto al control, lo que a su vez produce un incremento del índice de mutación. Pero para ninguna de las dos cepas, el índice es superior a 2,5, valor a partir del cual se considera un efecto mutagénico positivo (Ames, 1973).

La Figura 4.17 muestra la variación del número de revertientes de las cepas TA98 y TA100 respecto del control y la línea punteada marca el nivel a partir del cual se considera un efecto mutagénico positivo.

Los resultados para las cepas TA102 y TA104 evidencian que el número de revertientes de los tratamientos no difieren significativamente del control.

Los extractos acuosos y diclorometánicos de lodos de estaciones depuradoras de Madrid y Valladolid han demostrado que no tienen la capacidad de producir un efecto mutagénico sobre *Salmonella typhimurium*.

4.2.3.5 Líquidos de pirólisis obtenidos a partir de lodos de depuradora

Los líquidos de pirólisis de estaciones de depuración de Madrid y Valladolid obtenidos a 450, 530 y 650 °C fueron evaluados mediante los ensayos de mutagenicidad de incorporación en placa estándar, y las variantes metodológicas de incorporación en placa con pre-incubación (IPPI) e incorporación en placa para líquidos volátiles (IPLV). Para todos los casos con y sin activación metabólica.

Tabla 4.9 Mutagenicidad de extractos acuosos y diclorometánicos de lodos de depuradora destinados a valorización energética: LM =Lodo Madrid, LV= Lodo Valladolid. **Nº de revertientes** (desviación estándar) e índice de mutación.

Codo variable: N de revertientes (desviación estándar) e índice de mutación.																									
Tratamientos		-S9												+S9											
		TA98			TA100			TA102			TA104			TA98			TA100			TA102			TA104		
Acuosos																									
0		22	(0,58)		116	(1,15)		283	(1,00)		315	(2,52)		29	(0,58)		137	(1,00)		288	(1,00)		365	(2,52)	
LM	25	46	(2,89)	1,1	240	(0,58)	1,1	285	(1,73)	0,0	314	(2,00)	0,0	56	(2,65)	0,9	297	(2,00)	1,2	289	(1,53)	0,0	364	(4,00)	0,0
	50	43	(1,53)	0,9	243	(2,31)	1,1	282	(3,46)	0,0	320	(0,58)	0,0	54	(1,00)	0,8	298	(1,00)	1,2	290	(0,58)	0,0	365	(2,08)	0,0
	100	43	(1,15)	0,9	254	(3,61)	1,2	284	(3,21)	0,0	317	(3,51)	0,0	54	(1,73)	0,8	302	(1,53)	1,2	288	(0,58)	0,0	361	(1,15)	0,0
LV	25	27	(0,58)	0,2	157	(2,08)	0,4	282	(3,21)	0,0	315	(3,06)	0,0	37	(1,00)	0,3	235	(2,65)	0,7	289	(2,08)	0,0	365	(1,53)	0,0
	50	32	(2,08)	0,4	200	(3,06)	0,7	282	(2,31)	0,0	316	(3,06)	0,0	41	(1,00)	0,4	257	(2,08)	0,9	288	(1,73)	0,0	365	(2,31)	0,0
	100	34	(1,15)	0,5	201	(1,73)	0,7	283	(1,53)	0,0	320	(1,53)	0,0	41	(1,15)	0,4	266	(1,00)	0,9	288	(2,89)	0,0	366	(2,52)	0,0
Diclorometánicos																									
0		21	(1,53)		117	(0,58)		283	(1,00)		315	(1,53)		30	(0,58)		138	(0,58)		289	(0,58)		364	(1,15)	
MD	25	43	(1,53)	1,0	248	(2,52)	1,1	284	(1,53)	0,0	316	(4,04)	0,0	64	(2,08)	1,1	293	(2,31)	1,1	291	(1,53)	0,0	366	(3,79)	0,0
	50	45	(1,73)	1,1	262	(1,53)	1,2	286	(1,73)	0,0	316	(4,16)	0,0	64	(2,65)	1,2	298	(2,08)	1,2	288	(3,61)	0,0	368	(0,58)	0,0
	100	45	(0,58)	1,1	267	(1,73)	1,3	284	(3,21)	0,0	313	(0,58)	0,0	65	(1,15)	1,2	303	(3,61)	1,2	290	(2,52)	0,0	370	(1,00)	0,0
VD	25	41	(1,53)	0,9	244	(2,52)	1,1	281	(2,31)	0,0	317	(3,61)	0,0	54	(2,00)	0,8	289	(1,00)	1,1	291	(1,15)	0,0	363	(2,65)	0,0
	50	43	(2,31)	1,0	250	(5,20)	1,1	282	(2,08)	0,0	317	(2,31)	0,0	53	(1,00)	0,8	296	(5,51)	1,2	290	(2,65)	0,0	366	(1,53)	0,0
	100	44	(0,58)	1,0	257	(2,00)	1,2	284	(1,73)	0,0	314	(3,46)	0,0	56	(0,58)	0,9	303	(5,13)	1,2	286	(4,51)	0,0	363	(1,00)	0,0
Mut. estándar*		286	(3,06)	11,6	2.144	(9,54)	7,8	2.213	(2,77)	12,7	4.641	(2,65)	5,7	1.284	(4,51)	7,6	3.665	(5,31)	7,8	4657	(6,7)	9,7	5678	(6,34)	6,9

*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

Resultados

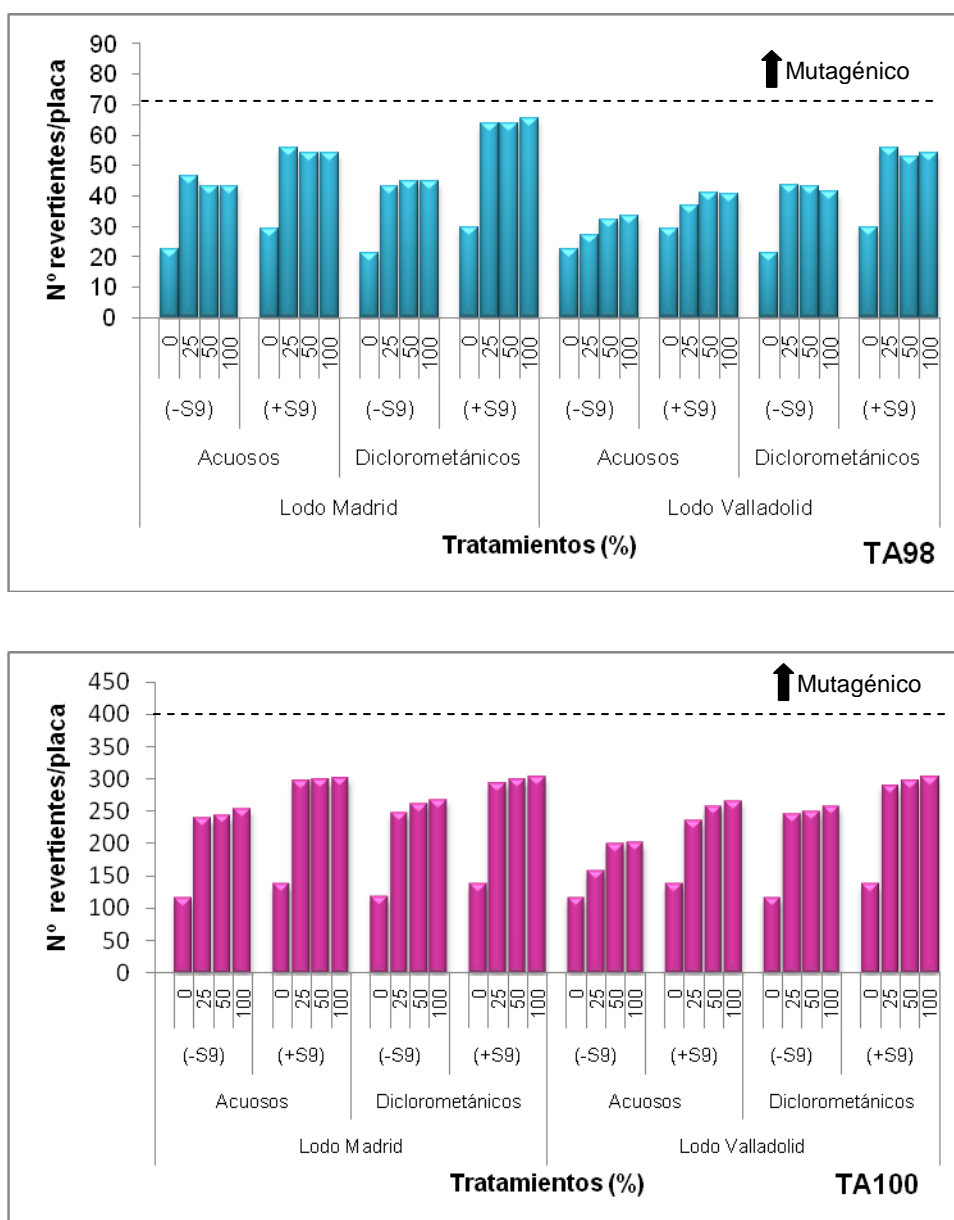


Figura 4.17. Efecto mutagénico de la adición de extractos acuosos y diclorometánicos de lodos destinados a valorización energética, con dosis de 0, 10, 25, 50 y 100% (v/v) sobre las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*. (-S9) = sin activación metabólica; (+S9) = con activación metabólica.

4.2.3.5.1 Ensayo de incorporación en placa estándar (IPE)

Debido a la toxicidad de los líquidos fueron necesarios experimentos previos para determinar el rango de concentraciones que permitan realizar las pruebas de mutagenicidad. Para ambos grupos de líquidos: Madrid y Valladolid, se determinaron como dosis de evaluación: 0, 15, 20 y 25% (v/v).

La tabla 4.10 muestra los valores promedio del número de revertientes, la desviación estándar y los índices de mutación para cada uno de los tratamientos. En la Figura 4.18

se representa el número de colonias revertientes para todos los tratamientos. Las líneas punteadas delimitan el nivel a partir del cual se considera un efecto mutagénico positivo (índice de mutación $\geq 2,5$).

Los resultados de los líquidos obtenidos a 450°C muestran que independientemente de la adición o no de un sistema de activación metabólico, no se evidencia un efecto mutagénico sobre las cepas TA98, TA100, TA102 y TA104 de *Salmonella Typhimurium*.

Los resultados de los líquidos obtenidos a 530°C muestran que los líquidos ejercen diferentes respuestas sobre las cepas empleadas. Para la cepa TA98 se puede observar que al 25% de dosis de exposición se produce un efecto mutagénico tanto para el líquido de Madrid como para el de Valladolid, con índices de mutación de 22,0 y 32,0 respectivamente. También se puede apreciar que cuando se adiciona S9, se produce un incremento del número de revertientes y por ende un incremento del índice de mutación. Otro aspecto a destacar es que la aplicación del sistema de S9 ha permitido identificar la mutagenicidad de una mezcla que inicialmente demostraba ser no mutagénica, como es el caso del líquido de Madrid al 20% de exposición. Los resultados con las cepas, muestran que sin S9 ninguno de los tratamientos es mutagénico, sin embargo cuando se añade la fracción de activación metabólica el líquido de Madrid ejerce un efecto mutagénico al 15% y dosis más altas revelan una disminución del número de revertientes. Para el caso de Valladolid la mutagenicidad se aprecia al 25% de exposición. Los resultados con la cepa TA102 muestran que solo el líquido Madrid es mutagénico al 15%, con S9 (Índice de mutación = 6,8). Sin embargo para la cepa TA104, ninguno de los tratamientos ha evidenciado un efecto mutagénico positivo, pero se destaca que para el líquido Madrid al 15%, incrementa el número de revertientes equivalente a un índice de mutación de 10,26.

Los resultados de los líquidos obtenidos a 650°C evidencian diferentes respuestas sobre las cepas de *Salmonella typhimurium*. Para la cepa TA98 se puede observar que en ambos líquidos el número de revertientes aumenta proporcionalmente con la dosis de exposición, detectándose un efecto mutagénico al 25%, sin S9. La adición de activación metabólica permite detectar la mutagenicidad a partir del 20% de exposición. Los resultados con la cepa TA100 demuestran que las mezclas de pirólisis ejercen mutagenicidad al 25%, con S9 (índices de mutación de 3,8 para Madrid y 9,0 para Valladolid). Para las cepas TA102 y TA104 ninguno de los tratamientos ejerce un efecto mutagénico sobre las cepas de *Salmonella typhimurium*.

Tabla 4.10. Mutagenicidad de líquidos de pirólisis obtenidos a 450°C, 530°C y 650 °C mediante ensayo de IPE. **Nº de revertientes (R)**, desviación estándar (DE) e índice de mutación (IM). Los valores en rojo identifican los IM positivos.

Tratamientos (%)		-S9												+S9											
		TA98			TA100			TA102			TA104			TA98			TA100			TA102			TA104		
		R	DS	IM	R	DS	IM	R	DS	IM	R	DS	IM	R	DS	IM	R	DS	IM	R	DS	IM	R	DS	IM
Control	0	22	0,58		116	1,15		283	1,00		315	2,52		29	0,58		137	1,00		288	1,00		365	2,52	
Madrid																									
450°C	15	23	0,58	0,0	174	3,21	0,5	282	2,00	0,0	308	3,51	0,0	24	5,51	-0,2	138	2,52	0,0	286	2,31	0,0	408	3,21	0,1
	20	21	1,00	-0,1	187	2,08	0,6	286	2,31	0,0	327	1,73	0,0	30	2,08	0,0	137	2,08	0,0	287	2,31	0,0	407	37,54	0,1
	25	21	1,15	-0,1	185	1,53	0,6	284	1,73	0,0	327	1,53	0,0	29	0,58	0,0	147	2,08	0,1	290	1,73	0,0	379	14,57	0,0
530°C	15	22	2,65	0,0	142	1,53	0,2	316	3,61	0,1	215	5,51	-0,3	35	3,61	0,2	1.704	367,51	11,4	2.252	10,21	6,8	1.079	10,26	2,0
	20	50	2,08	1,3	137	2,00	0,2	370	6,51	0,3	196	4,04	-0,4	953	31,90	31,1	97	0,58	-0,3	453	16,09	0,6	755	4,62	1,1
	25	490	5,13	22,0	146	0,58	0,2	399	0,58	0,4	135	5,69	-0,6	978	31,18	32,0	100	1,73	-0,3	422	10,07	0,5	91	1,00	-0,8
650°C	15	45	1,00	1,1	123	1,53	0,1	284	3,21	0,0	94	3,06	-0,7	78	1,00	1,6	167	1,00	0,2	751	21,17	1,6	226	3,06	-0,4
	20	66	0,58	2,1	222	0,58	0,9	286	1,73	0,0	92	0,00	-0,7	121	0,58	3,1	200	1,15	0,5	338	5,03	0,2	156	2,52	-0,6
	25	146	1,00	5,8	323	8,62	1,8	284	1,53	0,0	72	1,53	-0,8	221	2,08	6,5	656	10,50	3,8	110	2,00	-0,6	108	0,58	-0,7
Valladolid																									
450°C	15	23	0,58	0,0	110	3,51	0,1	283	3,79	0,0	328	2,52	0,0	29	2,65	0,0	135	2,52	0,0	287	2,08	0,0	475	27,75	0,3
	20	22	1,53	0,0	112	1,53	0,0	283	3,79	0,0	344	1,00	0,1	30	2,08	0,0	140	0,58	0,0	288	2,52	0,0	395	57,14	0,1
	25	24	0,58	0,1	142	2,65	0,2	284	2,31	0,0	394	3,06	0,2	28	1,15	-0,1	137	2,08	0,0	287	0,58	0,0	493	87,69	0,4
530°C	15	23	1,73	0,1	135	1,15	0,1	295	2,00	0,0	156	3,06	-0,5	66	0,58	1,2	304	4,04	0,1	424	3,61	0,5	550	5,03	0,5
	20	46	2,65	1,2	158	1,00	0,3	318	6,66	0,1	109	6,08	-0,7	98	1,53	2,3	326	7,00	0,6	603	4,62	1,1	224	6,81	-0,4
	25	215	2,52	9,1	299	0,58	1,5	400	2,08	0,4	75	3,79	-0,8	448	4,00	14,1	995	5,03	0,9	899	3,00	2,1	196	4,93	-0,5
650°C	15	897	6,43	41,1	188	0,58	0,6	285	2,65	0,0	256	0,58	-0,3	1.239	5,51	40,8	244	1,00	0,8	326	0,58	0,1	343	3,51	-0,1
	20	32	3,51	0,5	201	1,53	0,7	280	2,89	0,0	253	2,00	-0,3	12	0,58	-0,6	335	1,00	1,4	459	6,81	0,6	459	2,00	0,3
	25	11	1,15	-0,5	995	1,00	7,5	284	3,79	0,0	243	2,52	-0,3	7	0,58	-0,8	1.372	27,01	9,0	543	2,00	0,9	501	1,53	0,4
Mut. Est.*		286	3,06	11,6	2.144	9,54	7,8	2.213	2,77	12,7	4.641	2,65	5,7	1.284	4,51	7,6	3.665	5,31	7,8	4657	6,7	9,7	5678	6,34	6,9

*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

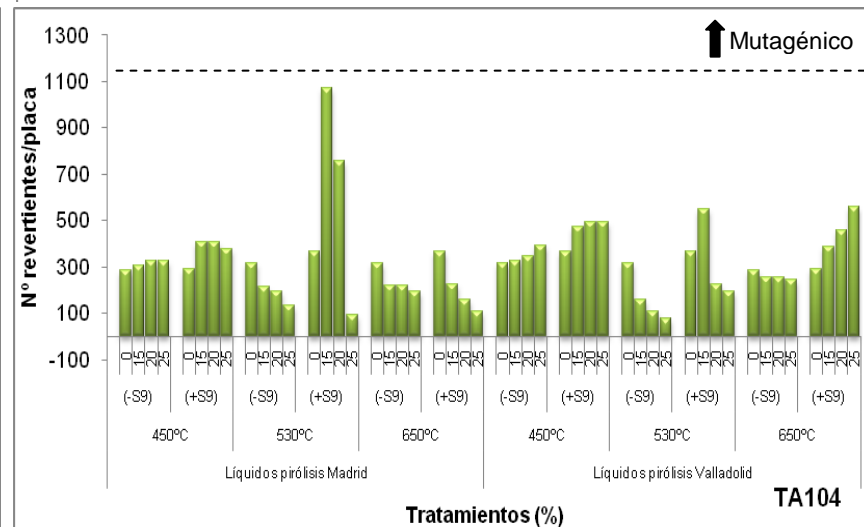
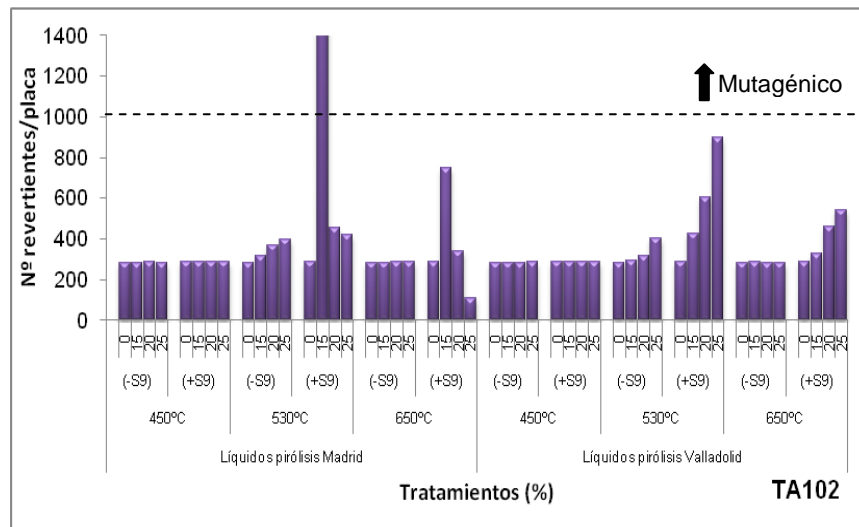
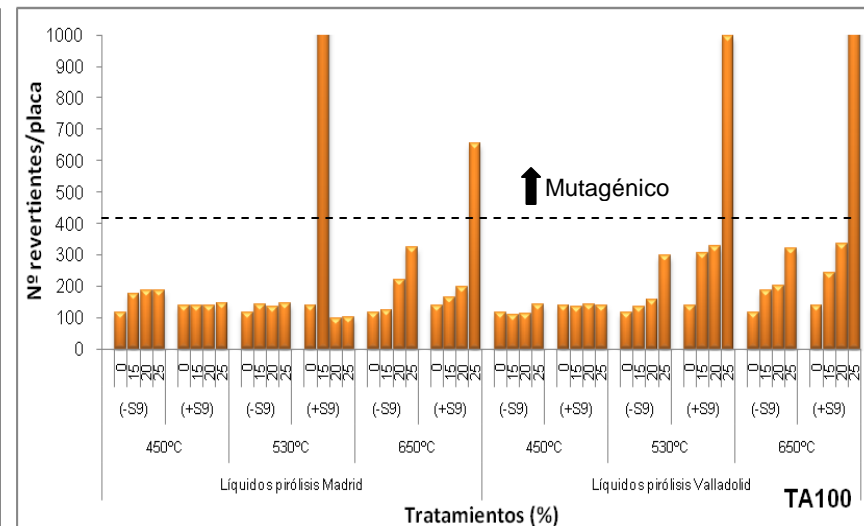
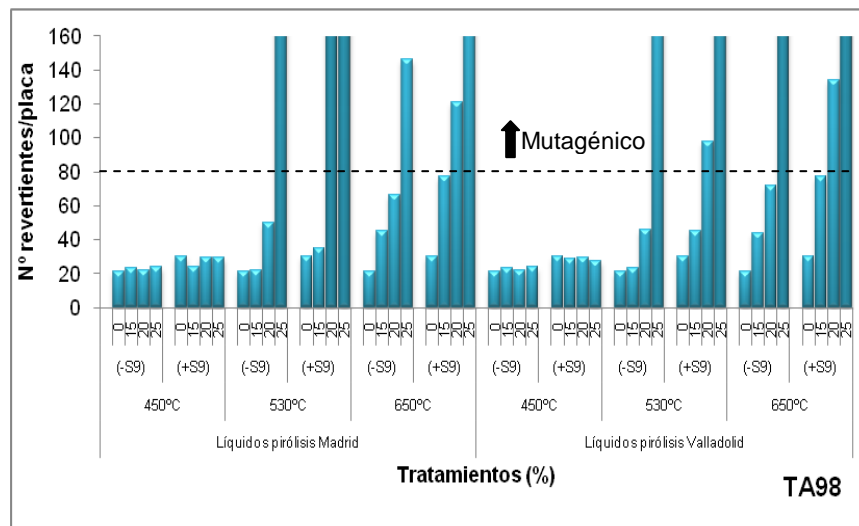


Figura 4.18. Efecto mutagénico de la adición de líquidos de pirólisis, con dosis de 0, 15, 20 y 25% (v/v) sobre las cepas TA98, TA100, TA102 y TA 104 de *Salmonella typhimurium*. (-S9) = sin activación metabólica; (+S9) = con activación metabólica.

Resultados

4.2.3.4.2 Ensayo de incorporación en placa con pre-incubación (IPPI)

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con el ensayo de IPE se ha decidido aplicar la variante metodológica con pre-incubación para los líquidos de pirólisis obtenidos a 530°C.

Con la aplicación del ensayo de pre-incubación se ha visto que la toxicidad de los líquidos de pirólisis varía respecto a los determinados con el ensayo estándar, por lo que fueron necesarios experimentos previos para determinar nuevamente las dosis de exposición.

Para los líquidos de Madrid y Valladolid se han determinado como dosis de evaluación: 0, 5, 10 y 15% (v/v). La tabla 4.11 muestra los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos.

Los resultados muestran que en las cepas TA100, TA102 y TA104, se produce un incremento del número de revertientes conforme incrementa la dosis de exposición, pero en ninguno de los casos el índice de mutación es igual o superior a 2,5. Sin embargo para la cepa TA98 (Figura 4.19), se puede distinguir que el líquido de Madrid ejerce un efecto mutagénico con y sin S9, en cambio el líquido de Valladolid, produce mutagenicidad solo cuando se añade el sistema de activación microsomal.

4.2.3.5.3 Ensayo de incorporación en placa para líquidos volátiles (IPLV)

Los líquidos de pirólisis Madrid y Valladolid obtenidos a 530°C fueron evaluados mediante el ensayo de IPLV. Las dosis de evaluación fueron las mismas que se aplicaron en el ensayo estándar: 0, 15, 20 y 25% (v/v).

En la tabla 4.12 se muestran el valor promedio del número de revertientes, desviación estándar y el índice de mutación para cada uno de los tratamientos. Se puede distinguir que para las cepas TA100, TA102 y TA104 el número de revertientes no difiere significativamente del control, por lo que los índices de mutación son inferiores a 0,5. Sin embargo para la cepa TA98 (Figura 4.20), se puede apreciar que existe una relación directamente proporcional entre número de revertientes y dosis de exposición, sin embargo en ninguno de los casos el índice de mutación supera el 2,5, valor a partir del cual se considera un efecto mutagénico positivo.

Tabla 4.11 Mutagenicidad del líquido de pirólisis obtenido a 530 °C mediante IPPI. N° de revertientes (R), desviación estándar (DE) e índice de mutación (IM). Los valores en rojo indican un IM positivo.

Tratamientos (%)		TA98			TA100			TA102			TA104		
		R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM
Madrid													
(-S9)	0	24	(1,00)	0,0	139	(8,74)	0,0	267	0,58	0,0	310	4,93	0,0
	5	66	2,65	1,8	187	2,08	0,4	300	2,08	0,1	319	3,79	0,0
	10	95	2,08	2,9	191	1,53	0,4	306	3,51	0,1	332	2,31	0,1
	15	100	3,00	3,2	198	0,58	0,4	392	0,58	0,5	349	0,58	0,1
(S9)	0	27	1,73	0,0	138	2,52	0,0	274	4,62	0,0	342	0,00	0,0
	5	104	1,15	2,8	131	1,15	-0,1	404	1,00	0,5	396	3,79	0,2
	10	125	0,58	3,6	392	11,85	1,8	457	1,53	0,7	450	6,43	0,3
	15	166	1,53	5,2	452	0,58	2,3	900	0,00	2,3	1.162	54,17	2,4
Valladolid													
(-S9)	0	24	1,00	0,0	139	8,74	0,0	267	0,58	0,0	310	4,93	0,0
	5	24	1,53	0,0	136	4,16	0,0	264	1,15	0,0	317	2,52	0,0
	10	30	1,53	0,3	143	2,08	0,0	274	1,15	0,0	318	3,51	0,0
	15	67	2,08	1,8	236	2,08	0,7	294	3,61	0,1	325	1,53	0,1
(S9)	0	27	1,73	0,0	138	2,52	0,0	274	4,62	0,0	342	0,00	0,0
	5	32	1,00	0,2	141	2,08	0,0	280	1,53	0,0	346	3,61	0,0
	10	72	0,58	1,7	194	7,00	0,4	397	4,04	0,4	354	1,53	0,0
	15	532	1,53	18,7	384	4,58	1,8	439	2,52	0,6	402	1,53	0,2
Mut.Est.*													

*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

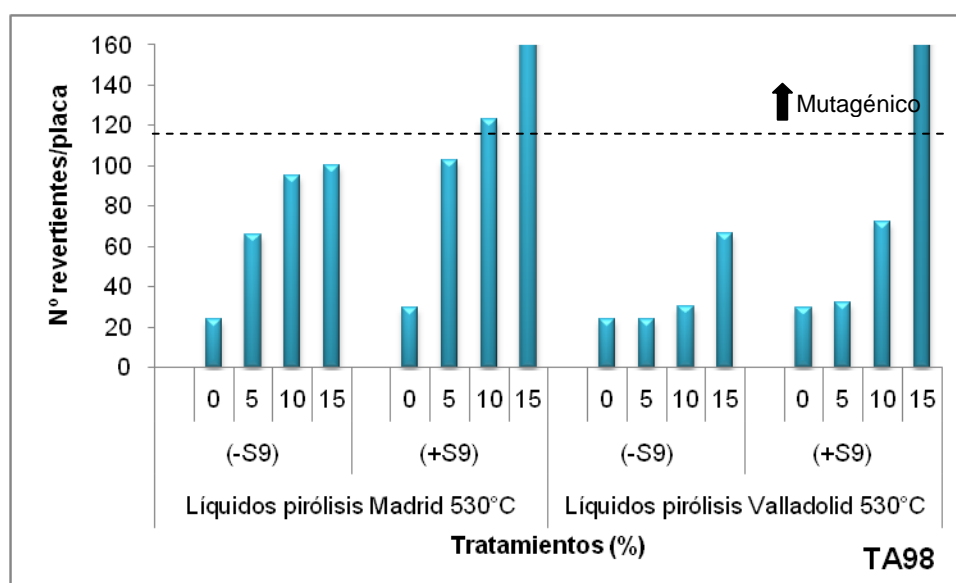


Figura 4.19. Efecto mutagénico de la adición de líquidos de pirólisis, con dosis de 0, 5, 10 y 15% (v/v) sobre la cepas TA98 de *Salmonella typhimurium* mediante el método IPPI (-S9) = sin activación metabólica; (+S9) = con activación metabólica.

Resultados

Tabla 4.12 Mutagenicidad del líquido de pirólisis obtenido a 530 °C mediante el método de IPLV. Nº de revertientes (R), desviación estándar (DE) e índice de mutación (IM).

Tratamientos		TA98			TA100			TA102			TA104		
(%)		R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM
Madrid													
(-S9)	0	24	2,00	0,0	124	2,52	0,0	224	3,61	0,0	316	2,65	0,0
	5	39	1,15	0,6	126	1,53	0,0	226	1,53	0,0	314	2,08	0,0
	10	49	0,58	1,1	127	1,15	0,0	228	2,31	0,0	317	1,53	0,0
	15	56	1,00	1,3	127	2,89	0,0	226	1,53	0,0	319	1,00	0,0
(S9)	0	30	1,53	0,0	138	2,52	0,0	274	4,62	0,0	362	3,21	0,0
	5	69	1,15	1,3	135	2,52	0,0	325	4,04	0,2	363	2,89	0,0
	10	78	1,73	1,6	138	1,53	0,0	330	2,65	0,2	365	2,52	0,0
	15	80	2,31	1,7	139	0,00	0,0	334	1,00	0,2	365	3,61	0,0
Valladolid													
(-S9)	0	24	2,00	0,0	124	2,52	0,0	224	3,61	0,0	316	2,65	0,0
	5	33	0,58	0,4	129	0,58	0,0	281	2,31	0,3	311	1,53	0,0
	10	42	2,00	0,8	131	1,15	0,1	284	0,58	0,3	317	2,89	0,0
	15	45	1,15	0,9	137	1,15	0,1	282	2,65	0,3	386	2,52	0,2
(S9)	0	30	1,53	0,0	138	2,52	0,0	274	4,62	0,0	362	3,21	0,0
	5	60	0,58	1,0	136	1,53	0,0	385	0,58	0,4	365	3,61	0,0
	10	68	1,53	1,3	138	2,00	0,0	388	2,08	0,4	365	4,16	0,0
	15	70	1,73	1,4	138	2,89	0,0	390	0,58	0,4	365	1,53	0,0
Mut.Est.*													

*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

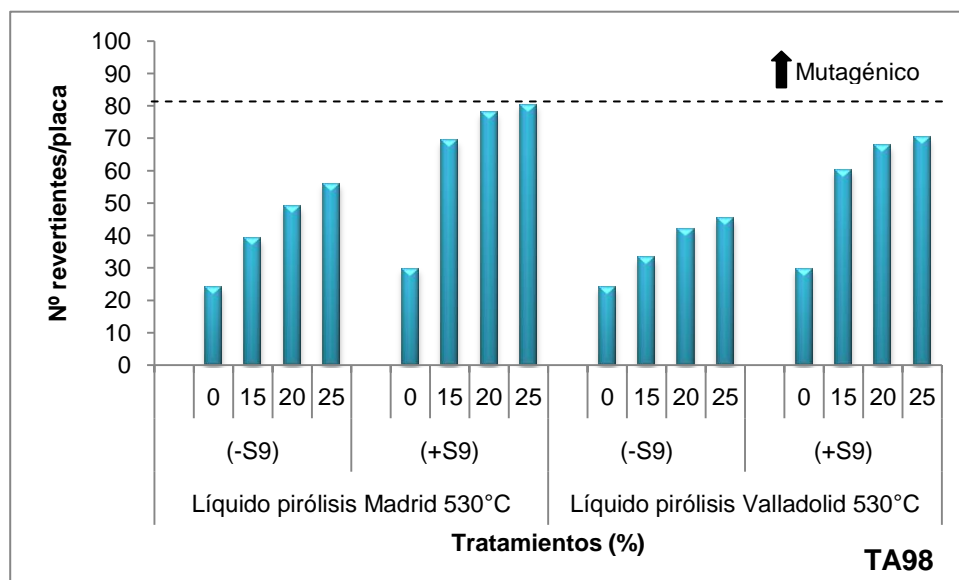


Figura 4.20. Efecto mutagénico de la adición de líquidos de pirólisis, con dosis de 0, 5, 10 y 15% (v/v) sobre la cepas TA98 de *Salmonella typhimurium* mediante el método de IPLV. (-S9) = sin activación metabólica; (+S9) = con activación metabólica.

4.8 Fraccionamiento de los líquidos de pirólisis de origen industrial-Madrid y urbano-Valladolid obtenidos a 530°C

El procedimiento de fraccionamiento fue detallado en el apartado 3.1.3.2. Los líquidos fueron fraccionados en tres fases: Superior, media e inferior. Debido a la variabilidad de toxicidad entre fases se han realizado experimentos previos para determinar las dosis de exposición.

Para la fase superior se determinaron como dosis 0, 10, 15 y 20 % (v/v), 0, 2, 3 y 4 % (v/v) para la fase media y 0, 50, 60 y 70 % (v/v) para la fase inferior.

En la tabla 4.13 y Figura 4.21 se muestran los resultados obtenidos para cada una de los tratamientos.

Los resultados muestran que la fase superior no tiene la capacidad de producir mutagenicidad sobre ninguna de las cepas de *Salmonella typhimurium*. Los índices de mutación reportados para esta fase no superan el 0,1. Respecto a la fase media, se puede observar que es la más tóxica de las tres y tiene la capacidad de producir mutagenicidad con y sin activación metabólica. Las cepas más sensibles a esta fase fueron TA98 y TA102, tanto para Madrid como para Valladolid. Se puede distinguir que la adición de S9 produce un incremento de la mutagenicidad. Para la cepa TA98 se reporta un índice de mutación máximo de 20,6 (+S9) para Madrid y 5,6 (+S9) para Valladolid, siendo por lo tanto, la fase media de Madrid más mutagénica que la de Valladolid. Respecto a la cepa TA102, se distingue un índice de mutación de 5,5 y 3,8 (+S9) para Madrid y Valladolid respectivamente. En los resultados de la fase inferior, se puede apreciar que ninguna de las dosis evaluadas tiene la capacidad de producir mutagenicidad sobre las cepas TA98, TA100, TA102 y TA104 de *Salmonella typhimurium*.

Los resultados de la evaluación mutagénica de las fases de los líquidos de pirólisis Madrid y Valladolid, obtenidos a 530°C, demuestran que de las tres fases evaluadas, la fase media, tiene la capacidad de generar un efecto mutagénico que es detectado por el ensayo de incorporación en placa estándar de *Salmonella typhimurium*.

Tabla 4.13. Mutagenicidad fases superior (Sup), media (Med) e inferior (Inf) de líquidos de pirólisis de origen industrial-Madrid y urbano-Valladolid obtenidos a 530°C. N° de revertientes (R), desviación estándar (DE) e índice de mutación (IM). Los valores en rojo identifican los IM positivos

Tratamientos (%)		-S9												+S9											
		TA98			TA100			TA102			TA104			TA98			TA100			TA102			TA104		
		R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM	R	DE	IM
Control Madrid	0	22	0,58		116	1,15		283	1,00		315	2,52		29	0,58		137	1,00		288	1,00		365	2,52	
	10	22	2,00	0,0	127	2,52	0,1	283	3,21	0,0	315	2,52	0,0	28	1,73	-0,1	142	1,53	0,0	287	1,15	0,0	366	5,20	0,0
	15	21	1,00	0,0	129	1,53	0,1	282	2,89	0,0	315	1,15	0,0	29	1,53	0,0	141	0,58	0,0	287	1,53	0,0	364	3,79	0,0
	20	19	0,58	-0,1	127	2,00	0,1	67	4,04	-0,8	126	4,62	-0,6	17	1,15	-0,4	144	2,00	0,0	137	1,53	-0,5	333	2,52	-0,1
	2	23	1,53	0,1	166	1,00	0,4	256	3,46	-0,1	53	2,08	-0,8	254	1,00	7,6	188	0,58	0,4	460	6,24	0,6	138	1,53	-0,6
	3	70	5,03	2,3	164	0,58	0,4	932	6,08	2,3	27	1,53	-0,9	345	4,51	10,6	189	1,73	0,4	1.244	10,02	3,3	135	3,21	-0,6
	4	259	6,11	11,2	156	1,53	0,3	1.464	98,51	4,2	22	1,73	-0,9	642	1,00	20,6	192	2,00	0,4	1.889	11,93	5,5	97	1,53	-0,7
	50	19	6,24	-0,1	116	2,08	0,0	283	2,08	0,0	316	4,00	0,0	25	1,53	-0,1	136	0,58	0,0	287	2,08	0,0	362	0,58	0,0
	60	21	1,53	0,0	119	1,53	0,0	152	1,73	-0,5	252	110,31	-0,2	26	1,73	-0,1	137	2,00	0,0	287	2,08	0,0	367	1,15	0,0
	70	23	2,08	0,1	121	1,15	0,0	149	7,21	-0,5	242	0,58	-0,2	26	3,46	-0,1	139	1,00	0,0	289	1,00	0,0	364	3,61	0,0
Valladolid																									
Sup	10	22	2,08	0,0	116	2,52	0,0	284	3,51	0,0	313	0,58	0,0	28	1,00	-0,1	138	1,15	0,0	288	3,06	0,0	367	8,08	0,0
	15	23	2,00	0,1	116	1,73	0,0	284	3,51	0,0	317	4,04	0,0	29	0,58	0,0	139	2,52	0,0	287	1,53	0,0	363	2,52	0,0
	20	24	1,00	0,1	117	2,89	0,0	284	2,89	0,0	348	59,18	0,1	30	1,53	0,0	137	1,53	0,0	287	1,53	0,0	364	2,31	0,0
Med	2	23	2,65	0,1	137	2,52	0,2	285	4,51	0,0	321	1,73	0,0	65	1,53	1,2	197	0,58	0,4	289	1,53	0,0	363	1,53	0,0
	3	64	2,08	2,0	143	2,08	0,2	285	2,65	0,0	313	1,15	0,0	128	1,53	3,3	199	1,53	0,4	276	39,26	0,0	365	1,53	0,0
	4	112	1,53	4,3	156	0,58	0,3	1.026	6,43	2,6	316	3,61	0,0	195	1,53	5,6	210	1,00	0,5	1.382	10,41	3,8	363	2,52	0,0
Inf	50	24	1,15	0,1	117	0,58	0,0	284	3,00	0,0	313	1,15	0,0	29	2,00	0,0	139	1,00	0,0	289	2,08	0,0	363	2,52	0,0
	60	22	2,89	0,0	118	1,73	0,0	281	2,31	0,0	190	108,25	-0,4	31	1,15	0,0	138	1,15	0,0	286	0,58	0,0	364	1,15	0,0
	70	21	1,73	0,0	117	2,00	0,0	283	2,65	0,0	317	2,52	0,0	30	2,65	0,0	136	2,31	0,0	286	0,58	0,0	364	4,51	0,0
Mut.Est*		286	3,06	11,6	2.144	9,54	7,8	2.213	2,77	12,7	4.641	2,65	5,7	1.284	4,51	7,6	3.665	5,31	7,8	4657	6,7	9,7	5678	6,34	6,9

*TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

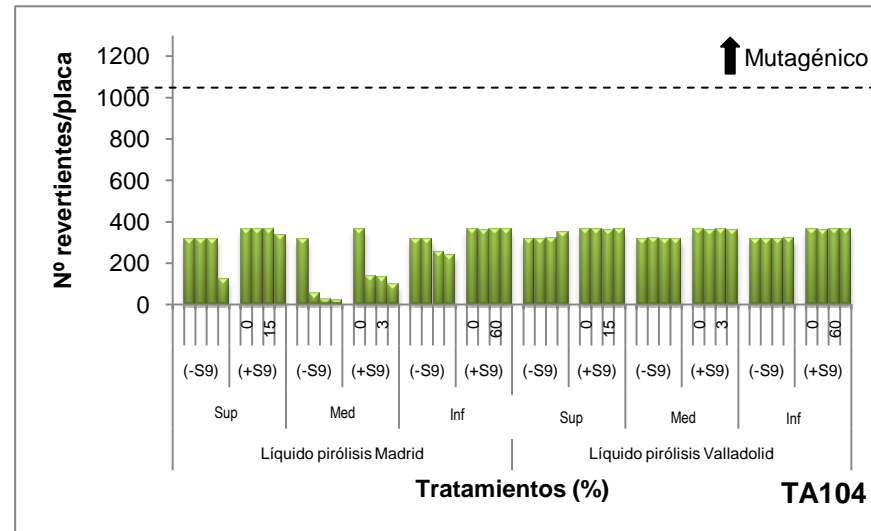
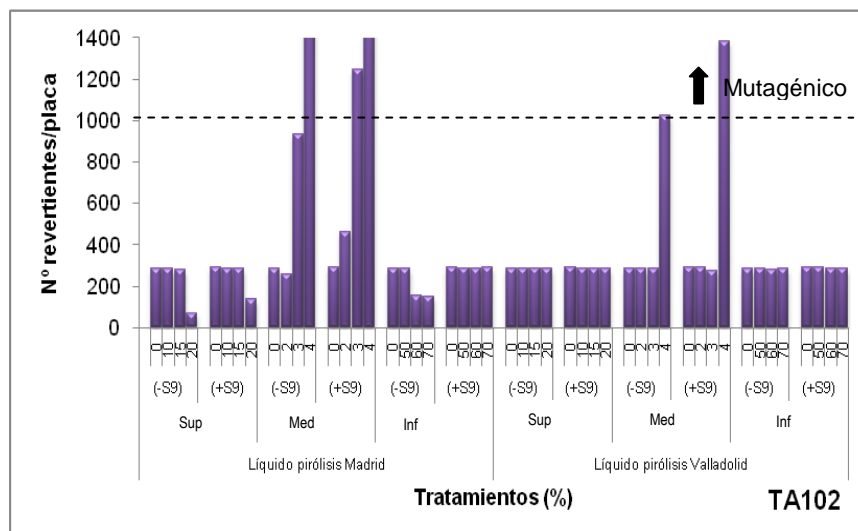
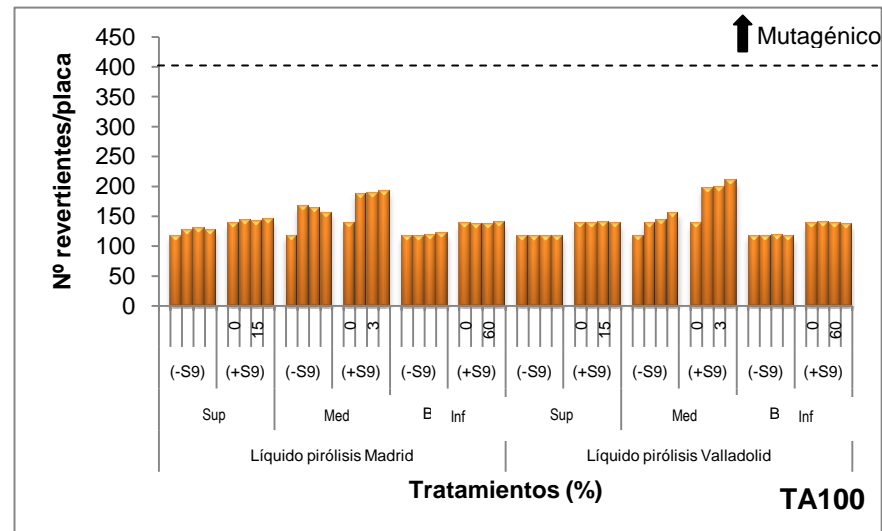
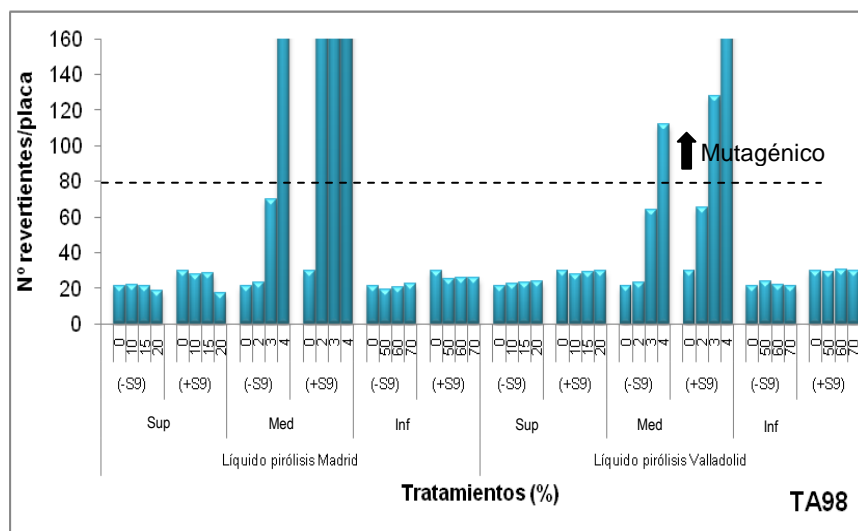


Figura 4.21. Efecto mutagénico de la adición de las fases superior (Sup) (0, 10, 15 y 20% v/v), media (Med) (0, 2, 3 y 4 % v/v) e Inferior (Inf) (0, 50, 60 y 70% v/v) de los líquidos de pirólisis Madrid y Valladolid obtenidos a 530°C sobre las cepas TA98, TA100, TA102 y TA 104 de *Salmonella typhimurium*. (-S9) = sin activación metabólica; (+S9) = con activación metabólica.

4.2.4 Evaluación genotóxica mediante el ensayo de mutación y recombinación somática (SMART) en *Drosophila melanogaster*

Se ha analizado la posible capacidad genotóxica de los líquidos de pirólisis que se obtienen a partir de lodos de las estaciones de depuración Madrid y Valladolid a 450, 530 y 650°C, mediante el ensayo SMART, versión alas, en *Drosophila melanogaster*.

Como se detalla en el apartado 3.3.4.3 se han empleado dos tipos de cruzamientos: estándar y alta bioactivación.

Los experimentos fueron realizados en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia).

Para cada experimento se han analizado tres concentraciones de los líquidos de pirólisis, un control negativo que corresponde al disolvente utilizado y un control positivo.

Los resultados obtenidos se exponen en tablas que recogen los siguientes datos:

- Nombre del líquido de pirólisis
- Concentraciones evaluadas
- Número de moscas analizadas
- Número de manchas encontradas, frecuencia de inducción de manchas, expresada como manchas/mosca. Estos datos se dan para cada uno de los tres grupos en los que se clasifican las manchas (manchas simples pequeñas (MSP), manchas simples grandes (MSG) y manchas gemelas (MG), así como para el total de manchas observados (TSM).
- Diagnóstico estadístico (resultante de la comparación entre los datos del control y los tratamientos), se ha realizado para cada concentración del líquido de pirólisis y para cada tipo de manchas.

La selección de las concentraciones adecuadas para la evaluación genotóxica se ha llevado a cabo mediante un análisis de toxicidad, utilizando una serie creciente de concentraciones, para determinar la viabilidad de los individuos de las cepas *mwh* y *ORR* frente a los líquidos de pirólisis.

Se han determinado como dosis de evaluación 0, 0.1, 0.5 y 1% (v/v), tanto para los líquidos de pirólisis Madrid y Valladolid.

Para todos los experimentos el valor promedio de la frecuencia del control (0,87 cruce estándar y 0.77 cruce alta bioactivación) fue concordante con el promedio histórico correspondiente al laboratorio en el que se llevo a cabo los experimentos, y no difieren significativamente de los resultados obtenidos por otros autores (Frei y Würzler, 1995). Por otro lado el control positivo, mitomicina C al 0,05 mM, ofreció una clara respuesta positiva, lo que avala la buena realización de los experimentos.

4.2.4.1 Evaluación genotóxica del líquido de pirólisis Madrid mediante los cruces estándar y alta bioactivación

Cruce estándar. La tabla 4.14 y figura 4.22 muestran los resultados obtenidos en el recuento de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Madrid, obtenidos a 450, 530 y 650°C, en las alas de las moscas transheterocigotas para los marcadores *mwh* y *flr*³ del cruce estándar.

Los resultados obtenidos muestran que el líquido de pirólisis obtenido a 450°C induce un incremento significativo en la frecuencia de manchas simples pequeñas cuando las dosis de exposición son de 0,5 y 1% (v/v).

Respecto a los resultados de los líquidos obtenidos a 530 y 650 °C, se puede distinguir que las tres dosis evaluadas, inducen un incremento significativo de la frecuencia de manchas simples pequeñas con respecto al control negativo.

Los líquidos de pirólisis no han inducido manchas gemelas. En el caso de las manchas simples grandes, su expresión no difiere significativamente del control.

Cruce alta bioactivación. En la tabla 4.15 y figura 4.23 se muestran los resultados obtenidos en el recuento de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Madrid, obtenidos a 450, 530 y 650°C, en las alas de las moscas transheterocigotas para los marcadores *mwh* y *flr*³ del cruce de alta bioactivación.

Se observa que las diferentes concentraciones evaluadas de los tres líquidos de pirólisis tienen la capacidad de inducir un incremento significativo en la frecuencia de manchas simples pequeñas y no así, manchas simples grandes o gemelas.

Tabla 4,14. Manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Madrid obtenidos a 450, 530 y 650 °C en el cruce estándar.

Tratamientos (%) v/v		Nº de moscas	Manchas por mosca												Total manchas <i>mwh</i> (<i>n</i>)
			MSP			MSG			MG			TM			
			(1-2 células) <i>m=2</i>			(>2 células) <i>m=5</i>			<i>m=5</i>			<i>m=2</i>			
			Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	
Control	0	30	14	0,47		1	0,03		0	0		15	0,50		15
	0,1	30	23	0,77	i	0	0,00	i	0	0,00	i	23	0,77	i	23
450°C	0,5	30	44	1,47	+	1	0,03	i	0	0,00	i	45	1,50	+	45
	1	30	43	1,43	+	6	0,20	i	1	0,03	i	50	1,67	+	50
530°C	0,1	30	66	2,20	+	0	0,00	i	0	0,00	i	66	2,20	+	66
	0,5	30	75	2,50	+	1	0,03	i	0	0,00	i	76	2,53	+	76
	1	30	76	2,53	+	1	0,03	i	1	0,03	i	78	2,60	+	78
650°C	0,1	30	33	1,10	+	0	0,00	i	0	0,00	i	33	1,10	+	33
	0,5	30	38	1,27	+	1	0,03	i	0	0,00	i	39	1,30	+	39
	1	30	37	1,23	+	0	0,00	i	0	0,00	i	37	1,23	+	37
MMC*		10													

MSP, manchas simples pequeñas; MSG, manchas simples grandes; MG, manchas gemelas; TM, total manchas.
Nº, número; Fr, frecuencia; D, Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; *i*, inconclusivo; *m*, factor de multiplicación. Nivel de significância, α = β = 0,05.

Tabla 4,15. Manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Madrid obtenidos a 450, 530 y 650 °C en el cruce de alta bioactivación.

Tratamientos (%) v/v		Nº de moscas	Manchas por mosca												Total manchas <i>mwh</i> (<i>n</i>)
			MSP			MSG			MG			TM			
			(1-2 células) <i>m=2</i>			(>2 células) <i>m=5</i>			<i>m=5</i>			<i>m=2</i>			
			Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	
Control	0	30	22	0,73		1	0,03		0	0		23	0,77		15
	0,1	30	42	1,40	+	1	0,03	i	0	0,00	i	43	1,43	+	43
450°C	0,5	30	49	1,63	+	0	0,00	i	1	0,03	i	50	1,67	+	50
	1	30	44	1,47	+	5	0,17	i	0	0,00	i	49	1,63	+	49
530°C	0,1	30	99	3,30	+	0	0,00	i	0	0,00	i	99	3,30	+	99
	0,5	30	85	2,83	+	1	0,03	i	0	0,00	i	86	2,87	+	86
	1	30	88	2,93	+	1	0,03	i	0	0,00	i	89	2,97	+	89
650°C	0,1	30	48	1,60	+	0	0,00	i	0	0,00	i	48	1,60	+	48
	0,5	30	46	1,53	+	1	0,03	i	0	0,00	i	47	1,57	+	47
	1	30	46	1,53	+	0	0,00	i	0	0,00	i	46	1,53	+	46
MMC*		10	45	4,5	+	36	3,6	+	15	1,5	+	96	9,6	+	96
MSP, manchas simples pequeñas; MSG, manchas simples grandes; MG, manchas gemelas; TM, total manchas. Nº, número; Fr, frecuencia; D, Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; <i>i</i> , inconclusivo; <i>m</i> , factor de multiplicación. Nivel de significância, α = β = 0,05.															

Resultados

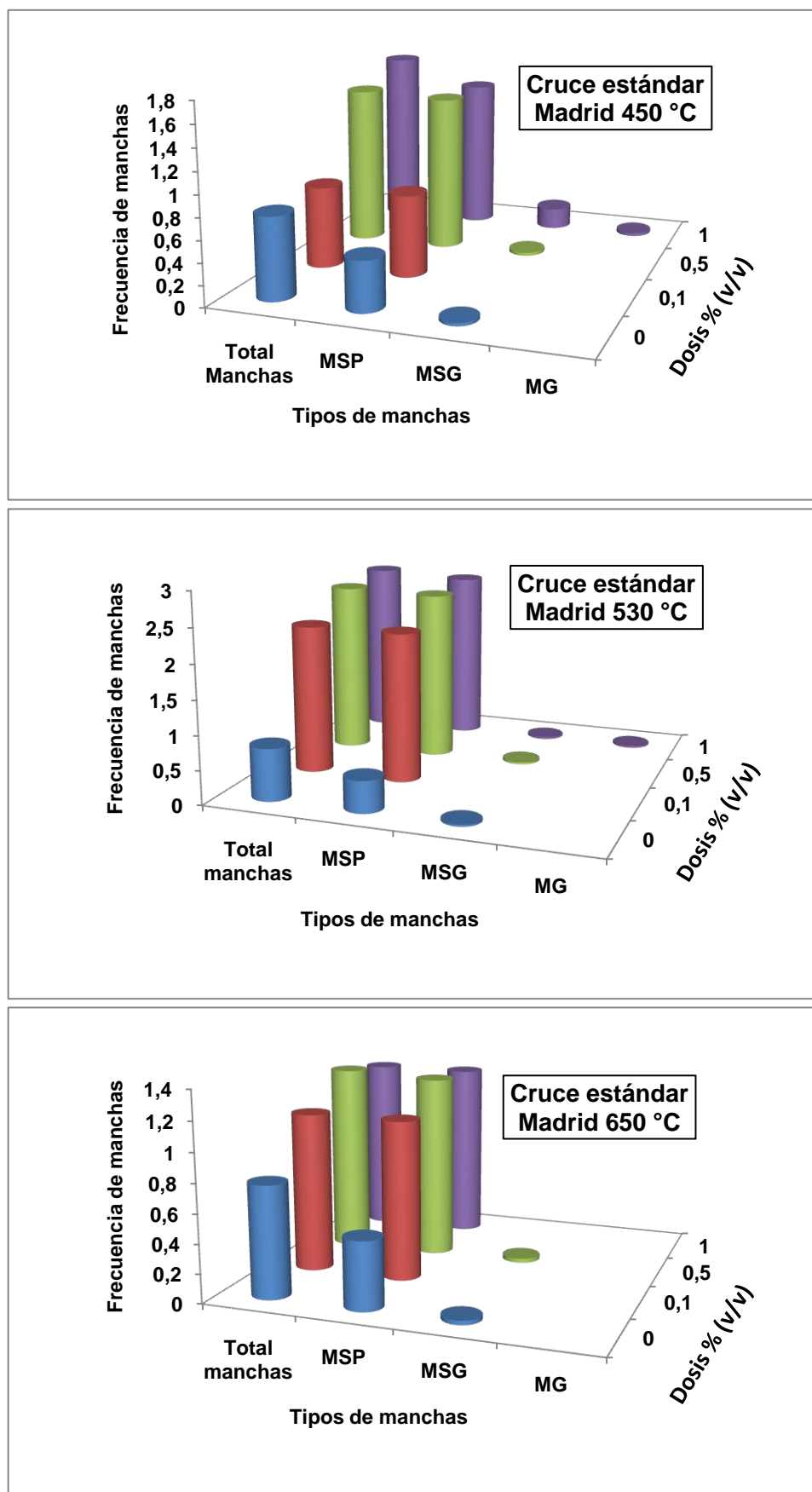


Figura 4.22. Frecuencia de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Madrid obtenidos a 450, 530 y 650 °C, en el **cruce estándar**. MSP, manchas simples pequeñas; MSG, manchas simples grandes; MG, manchas gemelas.

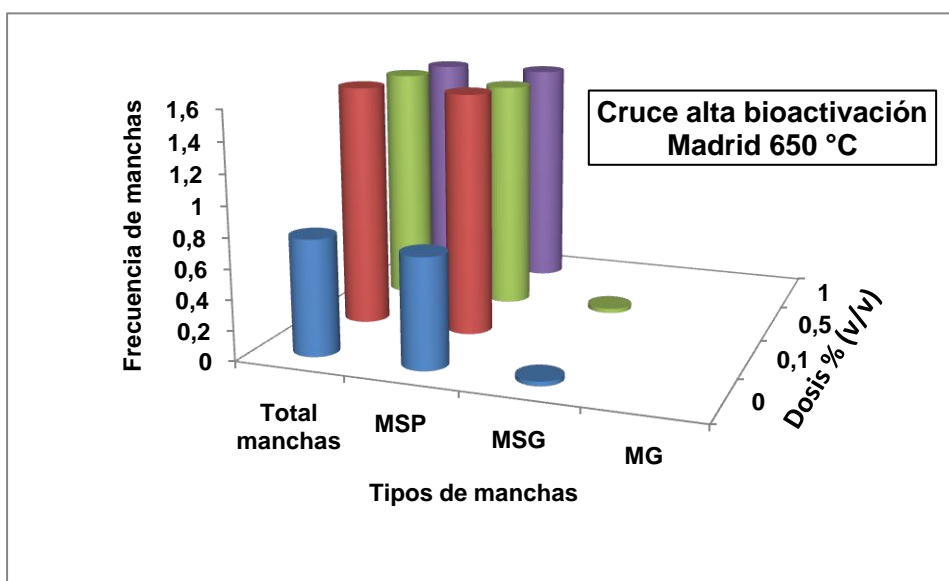
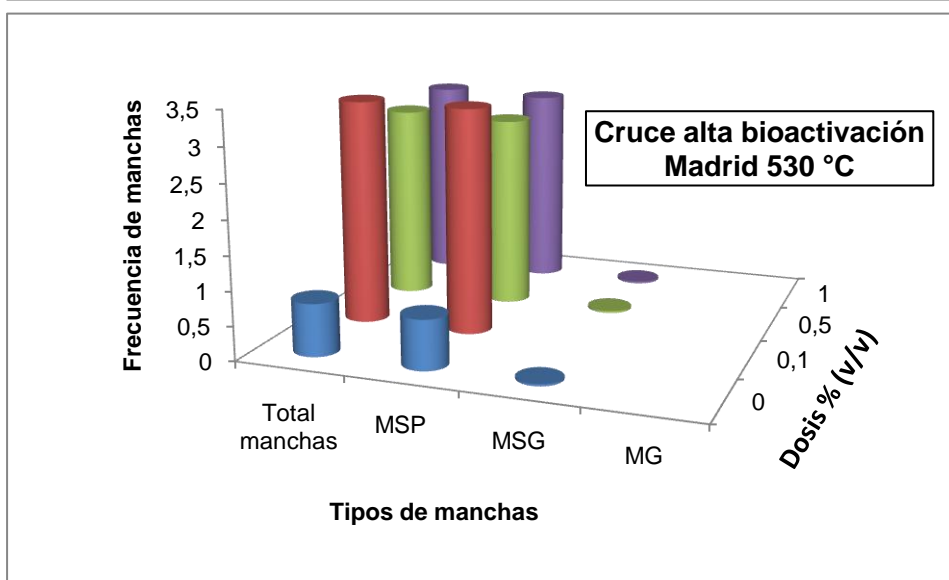
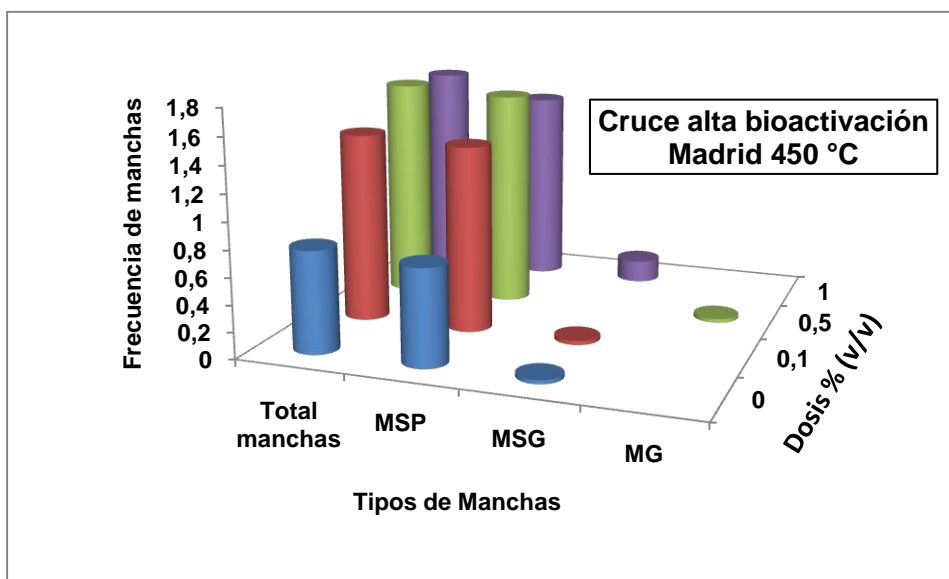


Figura 4.23. Frecuencia de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Madrid obtenidos a 450, 530 y 650 °C, en el **cruce alta bioactivación**. MSP, manchas simples pequeñas; MSG, manchas simples grandes; MG, manchas gemelas.

Tabla 4,16. Manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Valladolid obtenidos a 450, 530 y 650 °C en el cruce estándar.

Tratamientos (%) v/v		Nº de moscas	Manchas por mosca												Total manchas <i>mwh</i> (<i>n</i>)
			MSP			MSG			MG			TM			
			(1-2 células) <i>m=2</i>			(>2 células) <i>m=5</i>			<i>m=5</i>			<i>m=2</i>			
			Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	
Control	0	30	20	0,67		1	0,03		0	0,00		21	0,70		21
	0,1	30	16	0,53	-	1	0,03	i	0	0,00	i	17	0,57	-	17
450°C	0,5	30	18	0,60	-	1	0,03	i	0	0,00	i	19	0,63	-	19
	1	30	21	0,70	-	0	0,17	i	1	0,03	i	22	0,73	-	22
530°C	0,1	30	38	1,27	+	1	0,03	i	0	0,00	i	39	1,30	+	39
	0,5	30	39	1,30	+	0	0,00	i	0	0,00	i	39	1,30	+	39
	1	30	35	1,17	+	1	0,03	i	0	0,00	i	36	1,20	+	35
650°C	0,1	30	25	0,83	i	0	0,00	i	0	0,00	i	25	0,83	i	25
	0,5	30	19	0,63	-	1	0,03	i	0	0,00	i	20	0,67	-	20
	1	30	22	0,73	-	1	0,03	i	0	0,00	i	23	0,77	-	23
MMC [*]		10	56	5,6	+	47	4,7	+	21	2,1	+	124	12,4	+	124

MSP, manchas simples pequeñas; MSG, manchas simples grandes; MG, manchas gemelas; TM, total manchas.
Nº, número; Fr, frecuencia; D, Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; *i*, inconclusivo; *m*, factor de multiplicación. Nivel de significância, α = β = 0,05.

Tabla 4.17. Manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Valladolid obtenidos a 450, 530 y 650 °C en el cruce de alta bioactivación.

Tratamientos (%) v/v		Nº de moscas	Sectores mutantes por mosca												Total sectores mwh (n)
			MSP			MSG			MG			TSM			
			(1-2 células) m=2			(>2 células) m=5			m=5			m=2			
			Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	Nº	Fr	D ^a	
Control	0	30	25	0,83		1	0,03		0	0,00		26	0,87		26
450°C	0,1	30	22	0,73	-	1	0,03	i	0	0,00	i	23	0,77	-	23
	0,5	30	22	0,73	-	1	0,03	i	0	0,00	i	23	0,77	-	23
	1	30	27	0,90	-	0	0,00	i	0	0,00	i	27	0,90	-	27
530°C	0,1	30	51	1,70	+	1	0,03	i	0	0,00	i	52	1,73	+	52
	0,5	30	55	1,83	+	1	0,03	i	1	0,03	i	57	1,90	+	57
	1	30	56	1,87	+	1	0,03	i	0	0,00	i	57	1,90	+	57
650°C	1	30	32	1,07	i	0	0,00	i	0	0,00	i	32	1,07	-	33
	0,5	30	32	1,07	-	1	0,03	i	0	0,00	i	32	1,10	i	39
	0,1	30	29	0,97	-	1	0,03	i	0	0,00	i	30	1,00		37
MMC*		10													
MSP, manchas simples pequeñas; MSG, manchas simples grandes; MG, manchas gemelas; TM, total manchas. Nº, número; Fr, frecuencia; D, Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; <i>i</i> , inconclusivo; <i>m</i> , factor de multiplicación. Nivel de significância, α = β = 0,05.															

Resultados

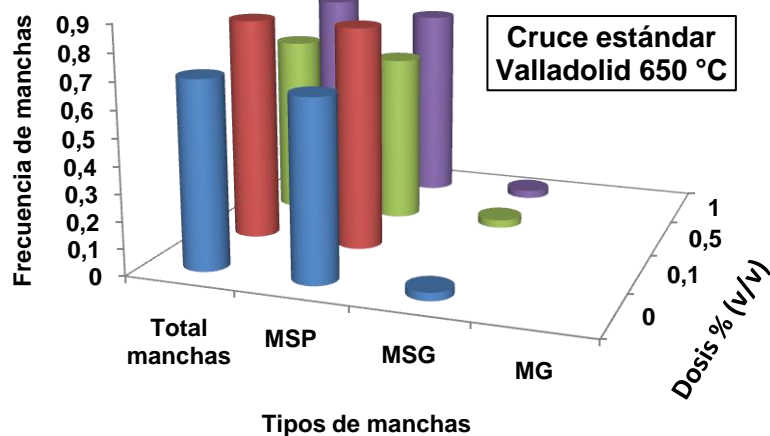
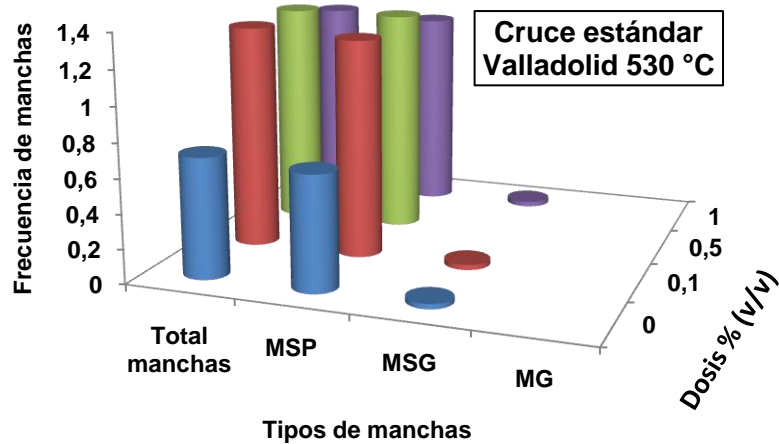
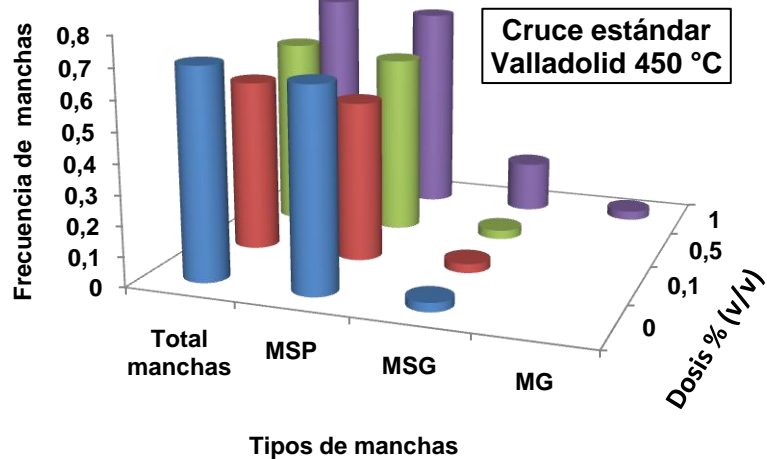


Figura 4.24. Frecuencia de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Valladolid obtenidos a 450, 530 y 650 °C, en el **cruce estándar**. MSP, manchas simples pequeñas; MSG, manchas simples grandes; MG, manchas gemelas.

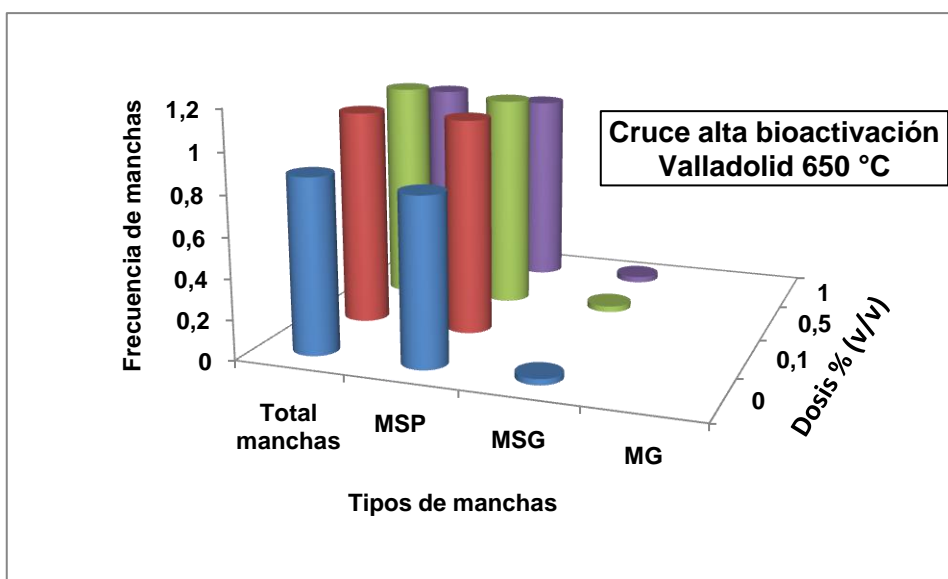
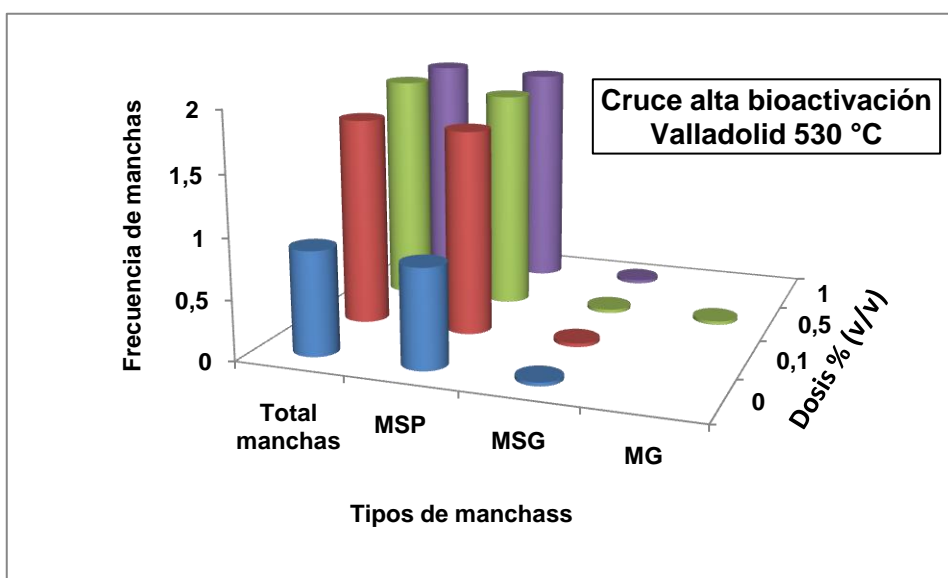
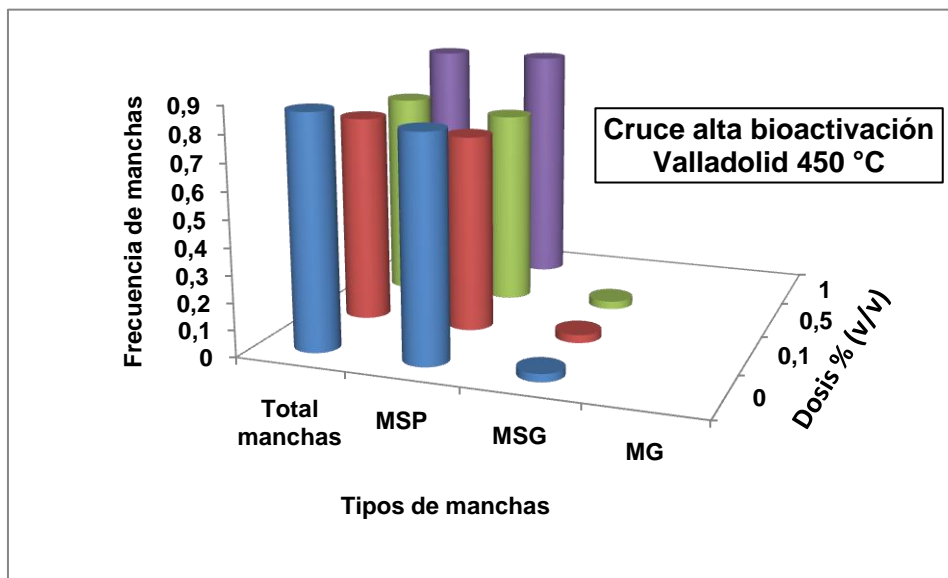


Figura 4.25. Frecuencia de manchas inducidas por los líquidos de pirólisis Valladolid obtenidos a 450, 530 y 650 °C, en el **cruce alta bioactivación**. MSP, manchas simples pequeñas; MSG, manchas simples grandes; MG, manchas gemelas.

4.2.4.2 Evaluación genotóxica del líquido de pirólisis Valladolid mediante el cruce estándar y alta bioactivación

Cruce estándar. En la tabla 4,16 y figura 4,24 se muestran los resultados obtenidos en el recuento de sectores mutantes inducidos por los líquidos de pirólisis Valladolid, obtenidos a 450, 530 y 650°C, en las alas de las moscas transheterocigotas para los marcadores *mwh* y *flr3* del cruce estándar.

Los resultados muestran que los líquidos de pirólisis obtenidos a 450 y 650°C, independientemente de las concentraciones evaluadas, no fueron capaces de inducir un incremento significativo en la frecuencia de ninguna de las tres categorías de sectores mutantes. Sin embargo las tres dosis evaluadas del líquido de pirólisis obtenido a 530°C, tiene la capacidad de inducir un incremento significativo de los sectores mutantes pequeños.

Cruce alta bioactivación. La tabla 4,17 y figura 4,25 muestran los resultados obtenidos en el recuento de sectores mutantes inducidos por los líquidos de pirólisis Valladolid, obtenidos a 450, 530 y 650°C, en las alas de las moscas transheterocigotas para los marcadores *mwh* y *flr3* del cruce de alta bioactivación.

Se puede observar que los líquidos de pirólisis obtenidos a 450°C y 650°C no tienen la capacidad de inducir un incremento en la frecuencia de ninguno de los sectores mutantes.

Los resultados del líquido de pirólisis obtenido a 530°C muestran que las diferentes dosis tienen la capacidad de inducir un incremento significativo en la frecuencia de sectores mutantes pequeños.

5. Discusión

El uso de parámetros físico-químicos para monitorizar mezclas complejas es un procedimiento limitado, porque frecuentemente es difícil alcanzar una caracterización completa de sus componentes. Por ello, el análisis químico debe ser complementado con ensayos biológicos, para apreciar la combinación de efectos y la transformación de los productos. En el proceso los componentes pueden interactuar unos con otros formando metabolitos persistentes o potenciales compuestos tóxicos (Mendoza y col., 2007; Escher y col., 2008; Bayo y col., 2009). Esto hace que sea necesaria la utilización de estudios combinados de modo tal, que se creen estrategias integradas entre análisis físico-químicos y ensayos biológicos, que permitan realizar una evaluación completa.

En este sentido, los ensayos ecotoxicológicos se pueden utilizar para una evaluación global de los efectos y los ensayos de genotoxicidad proporcionarían respuestas más específicas, que incluso nos permitirían conocer los mecanismos de acción (Aguayo y col., 2004; Escher y col., 2008; Bayo y col., 2009; Callahan y col., 1991). Actualmente los marcos regulatorios europeos como el nuevo Reglamento REACH promueven la aplicación de ensayos biológicos (Bayo y col., 2009), principalmente, aquellos que están catalogados como métodos alternativos a la experimentación animal, los cuales se hallan validados a nivel internacional por distintos organismos como son: el Centro Europeo de Validación de Métodos Alternativos (ECVAM), la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCED), el Centro Interdepartamental del Programa Nacional de Toxicología para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos (NICEATM), la Red Española de Métodos Alternativos (REMA), entre otros (Herrero, 2008; Liu y col., 1989).

El objetivo del presente trabajo se centró en realizar evaluaciones toxicológicas de diversas mezclas complejas mediante la aplicación de métodos alternativos a la experimentación animal. Para una mejor comprensión, las mezclas fueron divididas en tres grupos: 1, mezclas complejas relacionadas con la agricultura. 2, mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético. 3, mezclas complejas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora.

Los métodos alternativos empleados en este trabajo fueron elegidos teniendo en cuenta su amplia aplicación para la evaluación de compuestos puros, matrices ambientales, mezclas simples y mezclas complejas, así como su alta sensibilidad, reproducibilidad, reducido tiempo de expresión y bajos costes económicos.

Discusión

Es importante destacar que las diferentes evaluaciones toxicológicas fueron realizadas antes de conocer la caracterización química de las mezclas.

Grupo 1. Mezclas complejas relacionadas con la agricultura

Las muestras evaluadas en este grupo fueron:

- Lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora
- Suelos agrícolas enmendados con: lodo de depuradora, lodo compostado y compost de residuos sólidos urbanos.
- Enmiendas agrícolas: lodos de depuradora, lodo compostado y compost de residuos sólidos urbanos (RSU).

La generación de lodos de depuradoras y de residuos sólidos urbanos ha experimentado un crecimiento muy rápido en las últimas décadas, por lo que su gestión y tratamiento correcto se ha convertido en una de las prioridades de la política ambiental de la Unión Europea. Tomando en cuenta la composición química de estos residuos, se sabe que contienen altas concentraciones de materia orgánica (60-70%) y nutrientes para las plantas, tales como fósforo y nitrógeno (3, 1.5%) (European Commission Scientific and Technical Subcomponent Report, 2001; Stamatiadis y col., 1999). Por ello uno de los destinos finales más apropiados para estos materiales, previa estabilización biológica, es su aplicación a los suelos agrícolas, especialmente en la región mediterránea en la que la mayoría de los agrosistemas tienen un déficit marcado de materia orgánica (García-Gil, 2001).

Sin embargo, estas enmiendas también contienen una variedad de sustancias peligrosas, como son: contaminantes orgánicos, metales y patógenos, que podrían ir a la atmósfera como partículas aéreas, introducirse en aguas subterráneas o ser transferidos a las plantas e ingresar a la cadena alimenticia. (Tenenbaum, 1997; European Commission Scientific and Technical Subcomponent Report, 2001; Beck y col., 1996).

En esta tesis, la caracterización química de las mezclas de este grupo ha evidenciado que las concentraciones de “metales pesados”: Fe, Mn, Cu, Zn, Cr, Pb, Ni y Cd no rebasan los límites máximos permisibles por el Real Decreto 1310/1990. De la misma forma los macroelementos asimilables: P, K, Ca, Mg y Na se encuentran dentro del rango

de concentraciones permitidas, por lo tanto según Celis y col. (2007) podrían considerarse mezclas no perjudiciales para el ambiente

Empleando los ensayos ecotoxicológicos de germinación en semillas de *Lepidium sativum* (berro) y de inhibición de la luminiscencia en *Vibrio fischeri*, se ha podido determinar que los lixiviados de suelos agrícolas enmendados con lodos de depuradora no tienen la capacidad de producir efectos tóxicos en ninguna de las dos pruebas. Resultados similares fueron obtenidos por Shoji y col. (2008); Devare y Bahadir (1994) y Alveranga y col. (2008), quienes emplearon además especies como *Brassica rapa* y *Lemna minor*. Sin embargo Coz y col. (2004) y Aportela y col. (2006) obtuvieron resultados contrarios, demostrando que los lixiviados de lodos reducen significativamente el índice de germinación y que además tienen la capacidad de inhibir la luminiscencia de *V. fischeri*, inmovilizar a *Daphnia magna* y ejercer toxicidad sobre la lombriz de tierra *Eisenia fetida*, estos efectos se producirían principalmente porque los lixiviados contenían concentraciones de metales pesados, superiores a lo establecido por la norma.

Es importante tomar en cuenta que la calidad de los lixiviados está asociada no solamente a la concentración de metales pesados sino también a procesos de descomposición, condiciones climáticas y la tecnología aplicada para la disposición final de las enmiendas (Kiss y Encarnación, 1998), lo que puede influir en sus efectos de toxicidad.

Además de la evaluación de lixiviados, según Mao y col. (2009) los ensayos ecotoxicológicos son importantes a la hora de evaluar el nivel de contaminación de los suelos, principalmente si estos contienen enmiendas orgánicas. Los resultados de germinación que se han obtenido en esta tesis han demostrado que los suelos enmendados con lodo de depuradora, compost de lodo y compost de residuos sólidos urbanos favorecen la germinación de semillas de *Lepidium sativum* (> 80%) y promueven un óptimo desarrollo de la radícula e hipocótilo. Resultados similares fueron reportados por Gong y col. (2001) quienes emplearon además las especies *Avena sativa*, *Brassica rapa* y *Phaseolus vulgaris*. Esto se explica por la presencia de elementos asimilables como el N, P y K y oligoelementos como el Fe, Cu, Zn y Mo que son esenciales para el desarrollo de las plantas. Como sugieren Aportela y col. (2006), el aporte de N habría favoreciendo el crecimiento de la radícula e hipocótilo, el P habría jugado un papel

Discusión

importante a la hora de estimular la germinación de las semillas y el K contribuiría dando firmeza a los tejidos. Demostrando de esta forma la sensibilidad de la técnica.

Con el empleo del ensayo de *Vibrio fischeri* se ha podido demostrar que los extractos acuosos y diclorometánicos de suelos enmendados con lodo, compost de lodo y compost de residuos sólidos urbanos, no tienen la capacidad producir efectos tóxicos ya que en ninguno de los casos se ve una inhibición de la luminiscencia. Resultados similares fueron obtenidos por Bispo y col. (1999). Debido a la escasa literatura científica de evaluación de suelos mediante el ensayo de inhibición de luminiscencia resulta complicado realizar un análisis comparativo.

Aunque las muestras hasta ahora evaluadas han demostrado no tener efectos ecotóxicos, es importante llevar a cabo ensayos de genotoxicidad, debido principalmente a que muchos compuestos han demostrado producir efectos sobre el ADN cuando se hallan a concentraciones subtóxicas de exposición y más tomando en cuenta que se están realizando evaluaciones de mezclas complejas donde se producen una infinidad de reacciones entre los componentes propios de la mezcla.

Los resultados obtenidos con el ensayo de *salmonella*/microsoma, cepas TA98, TA100, TA102 y TA104 han demostrado que los suelos mezclas no tienen la capacidad de producir efectos mutagénicos, tal como lo habían descrito Mouchet y col. en el 2006. Investigaciones de mutagenicidad de Courty y col. (2004) y Knize y col. (1987) indican que a la hora de realizar la evaluación de extractos de suelos, entran en juego diferentes factores como la utilización del solvente, la temperatura a la que se produce la extracción, (óptima 37°C), y el tiempo de extracción no debe ser menor a 24 horas. En esta tesis se han tomado en cuenta todos estos aspectos.

La revisión bibliográfica demuestra que las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella* fueron las más utilizadas a la hora de evaluar una variedad de tipos de suelos: agrícolas y forestales (Cornejo, 2001), no agrícolas (Knize y col., 1987), colectados de áreas verdes (Courty y col., 2004), expuestos a tráfico de automóviles (Wesp y col., 2000), contaminados con HPA (Berti-Colti y col., 1998) y bioremediación de suelos (Courty y col., 2004). Sin embargo hasta la fecha resultados con la cepa TA102 son escasos y no se han encontrado datos con la cepa TA104.

Respecto a la evaluación de las enmiendas: lodo de depuradora, compost de lodo y compost de residuos sólidos urbanos, Fuentes y col. (2006) resaltan que la evaluación de la toxicidad de las mismas es importante para que posteriormente sean aplicados a los suelos, ya que de ellos dependerá la sustentabilidad de los agroecosistemas (Teuber y col., 2005).

En esta tesis los resultados ecotoxicológicos en *Lepidium sativum* demuestran que los extractos acuosos de los tres tipos de enmiendas no son fitotóxicos, obteniéndose índices de germinación superiores al 60%. Respuesta similar fue obtenida por Aportela y col. (2006); Acosta y col. (2004) y Wilke y col. (2008). A diferencia del resultados del extracto acuoso de lodo, el extracto diclorometánico produjo un descenso del índice de germinación inferior al 50%, siendo este porcentaje considerado fitotóxico (Zucconi y col., 1981b). Estos resultados son similares a los obtenidos por Ayuso y col. (1996), y Celis y col. (2006) en *Lactuca sativa*. La diferencia de expresión de resultados depende principalmente del solvente utilizado en la extracción como lo habían indicado Courty y col. (2004) y Knize y col. (1987).

A diferencia de la prueba tradicional de germinación, en este trabajo también se ha realizado la medición de la longitud de la radícula y del hipocótilo. Según Romero y Mendoza (2008), estos indicadores permiten ponderar el efecto tóxico de compuestos que posiblemente se hallan a concentraciones bajas, de modo tal, que no son suficientes para inhibir la germinación.

En esta tesis se ha podido observar que la longitud de radículas e hipocótilos por exposición a extractos acuosos de los tres tipos de enmiendas, no se ven afectadas ni por el tipo de tratamiento, ni por la dosis de evaluación. Sin embargo los resultados del extracto diclorometánico de lodo secado térmicamente, además de reducir el índice de germinación también interfiere en el desarrollo normal de la radícula. Por otro lado se ha podido determinar que el extracto diclorometánico del lodo compostado que inicialmente había demostrado no afectar al índice de germinación, tiene la capacidad de interferir negativamente en el desarrollo normal de la radícula pero no del hipocótilo. Esto demostraría que existen compuestos minoritarios que no actúan directamente en la inhibición de la germinación.

Discusión

Las evaluaciones ecotóxica en *Vibrio fischeri* y mutagénica en *Salmonella*/microsoma de los extractos acuosos y diclorometánicos de los tres tipos de enmiendas, han demostrado que ninguna de las mezclas tiene la capacidad de inhibir la luminiscencia de *V. fischeri* y tampoco producir efectos mutagénicos en las cepas TA98, TA100, TA102 y TA104 de *S. typhimurium*. Existe una escasa literatura científica de evaluación de enmiendas mediante el ensayo de inhibición de luminiscencia, lo que dificulta la realización de un análisis comparativo, a diferencia del ensayo de mutagenicidad mediante el cual se han realizado una variedad de evaluaciones, principalmente de lodos de depuradora, pero cuyo análisis se realizará en el siguiente apartado.

Grupo 2. Mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético

Este grupo estuvo comprendido por las siguientes mezclas:

- Lodo procedente de una planta de depuración de aguas residuales urbanas - Valladolid.
- Lodo procedente de una planta de depuración de aguas residuales industriales - Madrid.

El constante incremento de la producción de lodos procedentes de las estaciones de depuración es una problemática actual y reciente, motivo por el cual se está promoviendo su reutilización o valorización. Como se había explicado en el anterior apartado, uno de los principales destinos es la aplicación de los lodos como enmiendas de suelos agrícolas. Sin embargo también son empleados como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético, ya sea mediante procesos de gasificación, incineración o pirólisis.

Se ha decidido realizar la evaluación de dos lodos con diferente origen (urbano e industrial), debido a que diferentes estudios remarcan la importancia de diferenciarlos a la hora de decidir la ruta a la que van a ser destinados. Además, existen estudios contrastantes, unos demuestran que los lodos de origen urbano producen más efectos tóxicos que los industriales y otros demuestran lo contrario.

La caracterización físico-química de los dos tipos lodos indica que ambos cumplen con los límites máximos permisibles para “metales pesados”: Fe, Mn, Cu, Zn, Cr, Pb, Ni y Cd

y tampoco rebasan las concentraciones límite de los macroelementos asimilables: P, K, Ca, Mg y Na. (Real Decreto 1310/1990). Esto indicaría según Celis y col. (2007) que estos lodos son mezclas no perjudiciales para el ambiente, por lo que podrían ser utilizados además como enmiendas de suelos.

En esta tesis los resultados obtenidos mediante el ensayo de germinación en semillas de *L. sativum* demuestran que los extractos acuosos y diclorometánicos de lodos de origen urbano e industrial reducen significativamente el índice de germinación (< 50%), por lo que deberían ser considerados mezclas fitotóxicas (Oleszczuk, 2008a, b; Wong y col., 2001; Alveranga, 2007). Estos resultados son importantes porque permiten hacer una comparación con los lodos que estaban destinados a la agricultura.

Si se analiza la caracterización química de ambos grupos de lodos, se demuestra que independientemente de su origen, ninguno excede los límites máximos permisibles de “metales pesados” y otros elementos. Por lo tanto según varios estudios y la normativa legal, todos ellos serían aptos para su aplicación como enmiendas agrícolas (Papadimitriu y col., 2008; Zucconi y col., 1981a; Celis y col., 2007; Costa y col., 1991).

Es en este sentido cuando los ensayos biológicos adquieren importancia, ya que los resultados de esta tesis han demostrado que, aunque los lodos cumplen con la caracterización química exigida legalmente, tienen la capacidad de producir efectos tóxicos sobre *Lepidium sativum*. Por este motivo Ayuso y col. (1996), Fuentes y col. (2004 y 2006), Margesin y col. (2006), y Samaras y col. (2008) sugieren que el ensayo de germinación, no solamente debe ser utilizado para dar datos de toxicidad, sino también para informar del grado de madurez que tienen las enmiendas antes de que sean aplicadas a los suelos. Es así que varios estudios han empleado este ensayo para ver cómo cambia el nivel de toxicidad durante los procesos de compostaje, depuración de aguas residuales y bioremediación de suelos (Walter y col., 2006; Baud-Grasset y col., 1993).

Referente a los resultados obtenidos con el ensayo de *Vibrio fischeri*, se ha observado que los extractos acuosos y diclorometánicos del lodo de origen urbano-Valladolid no tienen la capacidad de inhibir la luminiscencia emitida por esta bacteria. Sin embargo, los extractos acuosos y diclorometánicos del lodo de origen industrial-Madrid han demostrado que inhiben en un 15% y 50%.

Discusión

Los resultados de Escher y col. (2008) fueron similares a los obtenidos con los extractos de lodo urbano-Valladolid, pero Mantis y col. (2005), Farre y Barceló (2003) determinaron que la presencia de “metales pesados” y compuestos de las familias de los PCBs, HPAs son los responsables de la toxicidad de los lodos cuando se evalúan mediante *V. fischeri*.

A diferencia de los resultados obtenidos con el ensayo de germinación, en el que no se observaba una clara diferencia entre la toxicidad del lodo de origen industrial y el urbano, con el ensayo de *Vibrio fischeri*, se ha podido distinguir claramente que el lodo de origen industrial-Madrid presenta niveles más altos de toxicidad que el lodo de origen urbano-Valladolid. Estos resultados son diferentes a los obtenidos por Mantis y col. (2005) y Farre y Barceló (2003), que demostraron que los lodos de origen urbano presentan mayor toxicidad.

En este trabajo, los resultados de la evaluación mutagénica de extractos acuosos y diclorometánicos de lodos urbanos e industriales destinados a la valorización energética, han demostrado que no producen mutagenicidad en las cepas TA98, TA100, TA102 y TA104 de *Salmonella typhimurium*.

Respecto a los lodos urbanos, Ottaviani y col. (1993) demostraron que lodos producidos en plantas de depuración de Roma, carecen de efectos mutagénicos. Sin embargo Hopke y col. (1982), Babish y col. (1983) y Blevins y Brennan (1990) demostraron que lodos de origen urbano de Estados Unidos tienen la capacidad de producir mutagenicidad en las cepas TA98 y TA100. Además, Mumma y col. (1983 y 1988), Brown y col. (1991) y Plewa y Hopke (1984), mediante caracterización química, demostraron que los lodos que se generan en pequeñas y grandes ciudades presentan un elevado número de sustancias tóxicas.

Rank y Nielsen (1998) emplearon además el ensayo de aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*, demostrando que los lodos de origen urbano tienen la capacidad de producir alteraciones cromosómicas en *Allium cepa*, pero que no tienen la capacidad de producir mutagenicidad en las cepas TA98 y TA100.

Con el empleo del ensayo de micronúcleos en *Tradescatia palludosa*, Mielli y col. (2009), demostraron que lodos urbanos tienen la capacidad de generar genotoxicidad.

Bibliografía de la evaluación de lodos de origen industrial es menor que la de los lodos de origen urbano. Se pueden mencionar los trabajos de Mathur y col. (2007), Clevenger y col., (1983), con el ensayo de *Salmonella*/microsoma empleando las cepas TA98 y TA100, sus resultados fueron negativos, indicando ausencia de mutagenicidad. Por otro lado, Klee y col. (2004) mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula, Krishnamurthi y col. (2008) mediante ensayo de aberraciones cromosómicas, también demostraron la ausencia de efectos genotóxicos.

El 95% de las investigaciones de la mutagenicidad de lodos mediante el ensayo de *Salmonella*/microsoma fueron realizadas con el empleo de las cepas TA98 y TA100, existen pocos datos con la cepa TA102 y no se ha encontrado información con la cepa TA104.

La batería de ensayos de ecotoxicidad y mutagenicidad empleados en la evaluación de mezclas complejas relacionadas con la agricultura y aquellas que son empleadas como materia prima para la valorización energética, han demostrado la importancia que tiene la aplicación de ensayos biológicos a la hora de determinar los efectos tóxicos. Principalmente porque, aunque la caracterización físico-química de las diferentes mezclas ha demostrado que cumplen con los límites máximos permisibles de metales pesados y otros elementos, nuestros resultados han demostrado que estas exigencias no son suficientes a la hora de valorar la toxicidad de mezclas complejas como los lodos de depuradora, los cuales, independientemente de su origen y destino, tienen la capacidad de producir daños biológicos, como son: la reducción del índice de germinación de semillas, la inhibición del crecimiento normal de radícula e hipocótilo y alterar las reacciones bioquímicas de la cadena respiratoria que se traduce en la inhibición de la luminiscencia emitida por *Vibrio fischeri*.

Grupo 3. Mezclas complejas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora

Los líquidos de pirólisis obtenidos de la valorización mediante pirólisis de lodos de depuradora fueron divididos en dos subgrupos:

- Líquidos de pirólisis sin fraccionar procedentes de lodos de origen urbano-Valladolid e industrial-Madrid.

Discusión

- Líquidos de pirólisis fraccionados procedentes de lodos de origen urbano-Valladolid e industrial-Madrid.

El objetivo de la pirólisis es la obtención de productos con alta capacidad energética (biocombustibles), por ello durante los últimos 25 años se han ido perfeccionando los procedimientos para su obtención. Las investigaciones han llegado a una etapa en la que se puede dar inicio a la comercialización de estos productos. Sin embargo, para lograr la comercialización se debe cumplir con diferentes procedimientos de seguridad, que permitan garantizar el bienestar de la salud humana y el medio ambiente. Por ello, es importante llevar a cabo estudios que impliquen, la caracterización química y las valoraciones de ecotoxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad.

Investigaciones de la caracterización química de estos líquidos, demuestran que su composición depende de la materia prima que se emplee, de las condiciones de operación y principalmente de la temperatura a la que se lleva a cabo la pirólisis (Fonts y col., 2009).

En esta tesis, el proceso de pirólisis para ambos lodos (urbano e industrial) fue llevado a cabo a tres temperaturas: 450°C, 530°C y 650°C. Por esta razón se han evaluado en total de 6 líquidos de pirólisis (urbano-Valladolid 450°C, 530°C y 650°C e industrial-Madrid 450°C, 530°C y 650°C). La caracterización química de todos ellos están desglosados en los anexos del 1 al 6, donde se puede apreciar que cada uno está conformado por más de cien compuestos químicos. Debido a la complejidad de estas mezclas, los compuestos fueron clasificados de acuerdo a su grupo funcional en 9 familias químicas: hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, HPAs, alifáticos oxigenados, alifáticos nitrogenados, aromáticos nitrogenados, esteroides, halogenuros y aromáticos sulfurados. Esta clasificación ha permitido observar que el porcentaje de HPAs aumenta proporcionalmente con la temperatura de pirólisis, como se muestra a continuación: líquido de origen urbano-Valladolid 2,26% (450°C) → 11,44% (530°C) → 36,99% (650°C) y líquido de origen industrial-Madrid 1,23% (450°C) → 9,11% (530°C) → 24,65% (650°C). De forma similar, Fonts y col. (2009) han demostrado que la temperatura es determinante a la hora de obtener compuestos con valor energético como los HPAs.

Líquidos de pirólisis sin fraccionar procedentes de lodos de origen urbano-Valladolid e industrial-Madrid.

Estas mezclas fueron evaluadas en tres etapas:

Etapas Primera

La primera evaluación toxicológica fue realizada mediante el ensayo de mutagenicidad de *Salmonella* /microsoma empleando las cepas TA98, TA100, TA102 y TA104. Estas cepas derivan de *Salmonella typhimurium* LT2, y poseen mutaciones en el operón de la histidina, de forma que requieren histidina en el medio de crecimiento porque son incapaces de sintetizarla. En caso de que las cepas se expongan a una sustancia o mezcla mutagénica se producen mutaciones que se observan por reversión al fenotipo salvaje.

La cepa TA98 presenta una mutación que se encuentra en el gen *hisD3052* que codifica para la histidinol deshidrogenasa. La mutación es de tipo "frameshift" y consiste en una adición de un par de bases próxima a una cadena de ocho restos de –GC- repetidos. Esta cepa responde a mutágenos que originan un desplazamiento en la lectura del ADN, que ocurre preferentemente en regiones que poseen secuencias de bases repetidas en tándem. La cepa TA100 posee una mutación que se halla en el gen *hisG46* que codifica para la primera enzima de la biosíntesis de la histidina. Esta mutación se determinó por secuenciación del ADN, y sustituye el par de bases A-T existente en el tipo salvaje, por el par G-C. Esta cepa detecta mutágenos que causan sustitución de pares de bases G-C. Las cepas TA102 y TA104 presentan una mutación en el gen *hisG428*. Esta mutación está presente en el plásmido multicopia pAQ1 en la cepa TA102 y en el cromosoma de la cepa TA104. Esta mutación es de tipo ocre, TAA, y puede ser revertida por los seis posibles cambios de pares de bases, transiciones como transversiones. Esta mutación también es revertida por mutágenos que causan daño oxidativo (Ames, ;Barrueco, 1986; Mortelmans y Zeiger, 2000)

Se ha demostrado que los líquidos obtenidos a 450°C, con y sin activación metabólica no tienen la capacidad de producir efectos mutagénicos en ninguna de las cepas de *S. typhimurium*. Sin embargo se debe tomar en cuenta que estas mezclas complejas albergan numerosas sustancias químicas como el benceno, estireno, flurorantreno y naftaleno que están clasificados como cancerígenos y posibles cancerígenos por la

Discusión

Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 1987, 2002a, 2002b). Ottaviani y col. (1983) señalan que cuando se trata de evaluar mezclas complejas, muchos compuestos químicos enmascaran la actividad mutagénica de otros, debido a que estos últimos se hallan en cantidades no significativas.

Es importante tomar en cuenta que los mecanismos de incorporación de xenobióticos, metabolismo, estructura cromosómica y procesos de reparación del ADN que presentan las células procariotas difieren de las células de mamífero. Por estas razones algunos agentes mutagénicos o carcinogénicos pueden dar una respuesta negativa en procariotas. Por otro lado se debe reconocer que el ensayo de *S. typhimurium* es empleado como una primera aproximación a la detección de la actividad genotóxica de una mezcla o compuesto, especialmente indicado para el caso de las mutaciones puntuales. Por esta razón es necesario evaluar estas mezclas mediante otros sistemas biológicos que permitan corroborar estos resultados.

También se ha demostrado que el líquido de pirólisis de origen urbano-Valladolid obtenido a 530°C, con y sin activación metabólica ejerce mutagenicidad que es detectada solamente por la cepa TA98, lo que indicaría que esta mezcla tiene la capacidad de inducir corrimiento en el marco de lectura. La mutagenicidad del líquido de origen industrial, en ausencia de activación metabólica ha sido identificada también por la cepa TA98, pero cuando se añade un sistema de activación metabólica, la mutagenicidad además es detectada por las cepas TA100 y TA102. Estos resultados indicarían esta mezcla contiene compuestos con actividad promutagénica, y que ejercen su efecto mediante procesos que: alteran el marco de lectura, producen sustitución de pares de bases G-C y daño oxidativo. La detección de mutagenicidad por parte de la cepa TA102, permite afirmar que la mezcla evaluada tiene la capacidad de bloquear el sistema de reparación, motivo por el cual se fija la mutación y se refleja en el incremento del número de revertientes.

Los líquidos de pirólisis Madrid y Valladolid obtenidos a 650°C demostraron que tienen la capacidad de ejercer un efecto tóxico y mutagénico en las cepas TA98 y TA100 de *Salmonella typhimurium*, con y sin activación metabólica. Esto permite afirmar que estas mezclas interactúan con el material genético mediante procesos de adición o delección de pares de bases y por inducción de corrimientos del marco de lectura.

El efecto mutagénico producido por estas mezclas, probablemente esté vinculado con el incremento de hidrocarburos alifáticos e HPAs que se produce cuando se elevan las temperaturas de pirólisis. El detalle de la composición química de los líquidos se encuentra detallado en los anexos 1 - 6. Es importante destacar que entre sus componentes se hallan el fenantreno, indeno clasificados por la IARC en el grupo 2 y los derivados del antraceno clasificados en el grupo 3.

Los resultados con la cepa TA104 evidencian que, el líquido de pirólisis de origen industrial-madrid 530°C, produce un incremento del número de revertientes, aunque este no es estadísticamente significativo.

De forma similar a los resultados que se han obtenido en este trabajo, Blin y col. (2005) demostraron que los líquidos de pirólisis son mutagénicos en las cepas TA1535, TA1537, TA98, TA100 y TA102.

La revisión bibliográfica no revela más estudios de líquidos de pirólisis mediante el ensayo de *Salmonella/microsoma*, de modo tal que los resultados de este trabajo permiten conocer más sobre los efectos que producen estas mezclas. Además es importante resaltar que esta es la primera vez que se evalúan estas mezclas con la cepa TA104.

Los estudios de mutagenicidad de líquidos de pirólisis mediante otros ensayos son escasos. Blin y col. (2005) demostraron mediante el ensayo de mutagenicidad *in vivo* de micronúcleos en médula ósea de ratón e *in vitro* mediante el ensayo de micronúcleos en células de linfoma de ratón, que estas mezclas tienen la capacidad de producir daños en el material genético, pero que estos datos deben ser confirmados mediante la aplicación de otros ensayos (Blin y col., 2005).

Etapas segunda

Tomando en cuenta que los líquidos de pirólisis son mezclas complejas que contienen una variedad de compuestos químicos, se ha querido afinar la metodología de *Salmonella/microsoma*, mediante dos variantes metodológicas: incorporación en placa con preincubación (IPPI) e incorporación en placa para líquidos volátiles (IPLV).

Discusión

Diversos autores señalan que estas variantes son adecuadas a la hora de potencializar la sensibilidad de los efectos mutagénicos (Hughes y col., 1987; Kado y col., 1983; Barber y col., 1981; Frantz y Sinsheimer, 1981; Matsushima y col., 1980; Baden y col., 1978; Fishbein, 1976 y Brem y col., 1974), y que permiten obtener información diferente a la que se consigue con el método de incorporación en placa estándar (Distlerath y col., 1984; Djalali-Behzad, y col., 1981; De Meester y col., 1980; Bridges, 1978 y Baden y col., 1976).

Según McCoy y col. (1978) los compuestos que inicialmente revelan una respuesta negativa en el método estándar, muchas veces resultan ser positivos en el método de IPLV. Otro estudio que demuestra la importancia de la aplicación de estas variantes metodológicas es el estudio de Pancorbo y col. (1989), quienes demostraron que el tolueno, xileno y tricloroetileno, eran mutagénicos en el método estándar y en el de líquidos volátiles, pero no cuando se aplica una etapa de preincubación.

Debido a que la mutagenicidad de los líquido de pirólisis de origen urbano e industrial obtenidos a 530°C, fue detectado por las cepas TA98, TA100 y TA102, se decidió someterlo a evaluaciones mediante IPPI e IPLV.

Con el empleo de la variante IPPI, la mezcla fue preincubada durante 20 minutos. Según Araki y col. (1994) el tiempo es determinante a la hora de aplicar esta variante metodológica, por lo que se ha seguido el protocolo propuesto por Mortelmans y Zeiger, (2000). Los resultados demostraron que la mezcla incrementa su toxicidad, motivo por el cual se tuvo que bajar las dosis de evaluación de 15%, 20% y 25% (v/v) a 5%, 10% y 15% (v/v). Un evento similar fue detectado por Barrueco y de la Peña (1991) y Nakajima y col. (2006), estos últimos, demostraron que el formaldehído y el tolueno aumentaban su toxicidad cuando se emplea el método de IPPI.

Probablemente la exposición de las cepas de *Salmonella* a menores concentraciones de los líquidos de pirólisis, permita detectar efectos mutagénicos que no son detectados por la metodología estándar. Los resultados demostraron que con la aplicación del método de IPPI, el líquido de origen urbano-Valladolid no es mutagénico en ausencia de S9, sin embargo con la aplicación de un sistema de activación metabólica se observa mutagenicidad en la cepa TA98 al 15% (v/v). A esta concentración, la metodología estándar había emitido un resultado negativo. El líquido de origen industrial-Madrid ha

demostrado que sin activación metabólica es mutagénico en la cepa TA98 al 10% y 15% (v/v) y cuando se añade la mezcla S9, además se observa mutagenicidad al 5% (v/v). Aunque solamente la cepa TA98 ha sido la más sensible, esta metodología ha podido detectar mutagenicidad a concentraciones más bajas que las detectadas por el método estándar.

El empleo de la variante metodológica IPLV, hasta la fecha no ha sido estandarizada, motivo por el cual se sugieren diversas formas para evaluar líquidos volátiles. Por ejemplo, mediante desecadores herméticamente cerrados (Mortelmans y Zeiger, 2000), utilización de bolsas Tedlar (Pancorbo y col., 1989) o mediante fabricación de cámaras de gas a escala (Araki y col, 1995). En este trabajo se ha optado por aplicar desecadores herméticamente cerrados. Con el método de IPLV se ha podido observar que al igual que en el método de IPPI, la toxicidad de los líquidos incrementa, motivo por el cual se han bajado las concentraciones de exposición a 5%, 10% y 15% (v/v). Los resultados de mutagenicidad con y sin activación metabólica han demostrado que en ninguna de las cepas se produce un incremento significativo del número de colonias revertientes, lo que indica el método de IPLV es menos sensible que los métodos estándar e IPPI, a la hora de evaluar la mutagenicidad de los líquidos de pirólisis.

Etapas tercera

Los líquidos de pirólisis fueron evaluados mediante el ensayo genotóxico de mutación y recombinación somática (SMART) en *D. melanogaster*. Este ensayo presenta una serie de ventajas a la hora de evaluar la actividad genotóxica de diferentes compuestos y mezclas complejas. Una de las principales ventajas radica en que es una prueba de corta duración, lo cual implica una evaluación rápida, sencilla y económica. Además se trata de un ensayo *in vivo* que utiliza un organismo eucariota no mamífero, evitando así los problemas de limitación en el número de individuos utilizados que lógicamente conllevan los ensayos con mamíferos. Y, por último, se trata de un ensayo que puede detectar un amplio rango de daño genético, entre ellos la recombinación mitótica, la cual es de mucho interés para la detección de compuestos o mezclas potencialmente cancerígenos, se ha señalado que este proceso puede estar relacionado con el desarrollo de cánceres en humanos (Stettler y Sengstag, 2001; Wijnhoven y col., 2003; Wang y col, 2006).

Discusión

Como ya se ha mencionado, este ensayo presenta una gran versatilidad, lo cual permite que su uso y aplicación sean muy variados. Así, los trabajos realizados hasta ahora, involucran diversas aéreas como por ejemplo, el estudio sobre la relación estructura-actividad de distintos grupos de compuestos químicos, la evaluación genotóxica de compuestos simples (Frölich y Würgler, 1990b; Spanó y col., 2001) y mezclas complejas (Frölich y Würgler 1990a; Sousa y col., 2003, Pillco y Rodrigo 2003) , estudios sobre antimutagénesis (Riski, 2005) tanto de compuestos específicos como de mezclas y la evaluación genotóxica de contaminantes ambientales (Amaral y col., 2006; Delgado-Rodriguez y col., 1999), entre otros.

A pesar de estas múltiples ventajas mostradas por el ensayo SMART, este no forma parte de la batería de ensayos utilizados habitualmente, porque no están reconocidos por la legislación como ensayos a utilizar para la evaluación genotóxica. Sin embargo existe una propuesta presentada ante la Organización de Cooperación para el Desarrollo Económico, para que los ensayos SMART se incluyan en la lista de ensayos oficialmente recomendados para el análisis de actividad genotóxica (Osaba, 1995).

Para evaluar la genotoxicidad de los 6 líquidos de pirólisis mediante el sistema *in vivo* SMART, se han empleado los cruce estándar y alta bioactivación. La importancia de diferenciarlos, se debe a que el segundo se caracteriza porque facilita considerablemente la detección de genotoxinas indirectas, es decir sustancias o mezclas que muestran su actividad genotóxica únicamente después de sufrir transformación metabólica. Frölich y Würgler (1989) y Graf y van Schaick (1992) indican que en el cruce de alta bioactivación se da lugar una mayor expresión de los genes involucrados en el sistema enzimático P450, especialmente CYP6a2. De hecho, Danielson y col. (1997, 1998) y Tijet y col. (2001) indican que, la familia CYP6 de *D. melanogaster* muestra grandes homologías con la familia CYP3 de vertebrados que junto con las familia CYP2, son responsables del metabolismos de drogas en vertebrados.

Larvas con 72 horas de vida (Graf, 1995) procedentes de los dos cruces fueron alimentadas con los líquidos de pirólisis. Con el fin de establecer las concentraciones adecuadas, se ha ensayado inicialmente la toxicidad de al menos 4 concentraciones. Inicialmente se realizaron pruebas con 10%, 15%, 20% y 25% (v/v), sin embargo el porcentaje de supervivientes era nulo, por tal motivo se continuaron bajando hasta 0,1%,

0,5% y 1% (v/v) donde se observó un porcentaje de supervivientes superior al 60%. Estas concentraciones permitieron la evaluación genotóxica mediante el análisis de las alas con genotipo *mwh/flr³* de *D. melanogaster*. Se ha contabilizado la frecuencia y el tamaño de manchas, registrándose así, manchas simples pequeñas (MSP), manchas simple grandes (MSG) y manchas gemelas (MG).

Los resultados que se han obtenido en esta tesis, demuestran que los líquidos de pirólisis de origen urbano-Valladolid, obtenidos a 450°C y 650°C, no incrementan significativamente ninguno de los tipos de manchas, lo que indica que no ejercen un efecto genotóxico en ninguno de los dos cruces. Sin embargo el líquido que se obtiene a 530°C, muestra que incrementa significativamente la frecuencia de MSP, lo que indica que esta mezcla presenta actividad genotóxica detectado por el ensayo SMART de alas.

Los resultados de los líquidos de origen industrial-Madrid, demuestran que mediante el cruce estándar los 3 líquidos (450°C, 530°C y 650°C) producen un incremento significativo en la frecuencia de MSP, excepto la menor concentración (0,1% v/v) del líquido obtenido a 450°C, cuyo resultado es inconcluyente. Sin embargo con la utilización del cruce de alta bioactivación, se ha podido observar que las frecuencias del total de manchas, incrementan ligeramente respecto a las observadas en el cruce estándar. El incremento es producido principalmente por MSP.

En primer lugar la comparación de los resultados obtenidos con ambos tipos de cruces permite estimar el papel que desempeñan las transformaciones metabólicas en el riesgo genotóxico asociado. En este caso se ha podido demostrar que los líquidos de pirólisis ejercen su genotoxicidad de forma directa, detectada por el cruce estándar, pero que la sobreexpresión del complejo enzimático P450 del cruce de alta bioactivación, favorece la producción de intermediarios reactivos que inducen un incremento en la frecuencia de MSP. Tomando en cuenta que las mezclas evaluadas tienen una elevada complejidad química, es difícil indicar que compuestos o familia química es la responsable de producir la genotoxicidad. La hipótesis que más se aceptaría en este caso, sería que el efecto genotóxico principalmente se debe a procesos de sinergismo entre pocos o varios componentes los líquidos de pirólisis.

Mediante la aplicación de SMART, también se ha podido observar que las MSP son las que incrementan significativamente y no así las MSG y MG. La clasificación de las

Discusión

manchas es importante a la hora de determinar el tipo de alteración genética que puede generar el compuesto o mezcla que se está evaluando. Las MSP y las MSG son producidas por procesos de delección, mutación puntual, ciertos tipos de translocación, no disyunción y recombinación mitótica que ocurre entre los dos marcadores *mwh* y *flr*³ (ver anexo 10), la importancia de diferenciarlas entre pequeñas y grandes, radica en que las MSG se producen por alteraciones genéticas que ocurren en las primeras divisiones mitóticas de las células del disco imaginal del ala y las MSP se producen en las últimas etapas de división celular. Esto permite indicar que los líquidos de pirólisis tienen la capacidad de ejercer su efecto genotóxico cuando las células que van a dar lugar a la formación del ala, están atravesando las últimas etapas de división celular. La aparición de MG, es indicador exclusivo de recombinación mitótica que ocurre entre el marcador proximal *flr*³ y el centrómero del cromosoma 3 (ver anexo 10). Consecuentemente si hay un incremento significativo de MG, se puede concluir que el compuesto o mezcla que se está evaluando tiene actividad recombinogénica (Graf, 1995), como ha sido el caso del control positivo que se ha empleado (MMC 0,05mM), pero no de los líquidos de pirólisis.

Por lo tanto la genotoxicidad de los líquidos de pirólisis, demostrada por el incremento de MSP puede deberse a alteraciones genéticas producidas por mutación puntual, delección, no disyunción o recombinación entre los marcadores *mwh* y *flr*³, pero no a procesos recombinogénicos.

Según Graf y col. (1984), las células portadoras de grandes delecciones, se dividen esporádicamente, pudiendo pasar como máximo dos ciclos de división mitótica lo que lleva a la expresión exclusiva de MSP. Por otro lado Palermo (2006) indica que una de las grandes delecciones producidas es la aneuploidia, que puede ser letal para las células afectadas, o puede alterar su capacidad de proliferación haciendo que se dividan más lentamente o que lo hagan solo por unas pocas divisiones; como consecuencia, cualquier agente aneuploidogénico solamente dará lugar a MSP, este hecho también fue demostrado por Vogel y Nivard (1993) y Zordan (2004).

Es importante destacar que después de la embriogénesis de *D. melanogaster*, existen alrededor de 10 a 30 células que conforman el disco imaginal del ala (Frei y Würgler, 1988), cuando eclosiona la larva de primer estadio, el número de células oscila entre 50 a 100, pero que después de atravesar varias etapas de división mitótica se conforman

30.000 células cuando empieza la etapa de pupa temprana. De estas células, alrededor de 24.400/ala son las que se han analizado bajo microscopio (29 de graf 1995), lo que incrementa el nivel de confianza de los resultados.

Realizando una revisión bibliográfica este trabajo sería el primero en emplear el ensayo *in vivo* SMART, para la evaluación genotóxica de líquidos de pirólisis. Por este motivo resulta difícil poder comparar los resultados con otras investigaciones. Comparando estos resultados con los obtenidos en el ensayo de *Salmonella*/microsoma, está clara la importancia de la aplicación de un ensayo con sistema de activación metabólica *in vivo*, ya que se ha podido demostrar que los líquidos de pirólisis obtenidos a 450°C que no producían mutagenicidad en ninguna de las cepas de *Salmonella*, tienen la capacidad de producir daños genotóxicos especialmente cuando se emplea el cruce de alta bioactivación.

Debido a las múltiples ventajas que presenta el ensayo SMART en alas, este trabajo considera que debería ser incorporado a la batería de ensayos a utilizar en la evaluación preliminar de un compuesto. Además al tratarse de un ensayo *in vivo*, la información obtenida presenta especial relevancia a la hora de extrapolar los resultados obtenidos a la especie humana. En este sentido se pronuncian también Kramers y col. (1991), quienes señalan que, si bien el ensayo de mutación génica en células de mamífero *in vitro* suele ser (junto a los ensayos microbianos y de aberraciones cromosómicas *in vitro*) el generalmente utilizado en la primera fase de evaluación genotóxica y, ya que en todos los ensayos *in vitro* se utiliza el mismo sistema de metabolización externa, la incorporación de un sistema *in vivo*, como SMART, podría contribuir a la eficaz evaluación de determinados compuestos.

Líquidos de pirólisis fraccionados procedentes de lodos de origen urbano-Valladolid e industrial-Madrid.

Los ensayos en *S. typhimurium* y *D. melanogaster* han demostrado que los líquidos de pirólisis tienen la capacidad de producir alteraciones en el material genético, sin embargo debido a la complejidad química de estas mezclas resulta difícil determinar que compuesto o compuestos están ejerciendo dichas alteraciones. Por este motivo se ha decidido someter al líquido de pirólisis de origen industrial-Madrid obtenido a 530°C a un proceso de fraccionamiento mediante centrifugación, obteniéndose así tres fases:

Discusión

superior, media e inferior. Se ha elegido este líquido por que ha sido el que ha demostrado producir los niveles más altos de mutagenicidad y genotoxicidad.

La evaluación de las fases se ha realizado mediante el ensayo de incorporación en placa estándar de *Salmonella*/microsoma, cepas TA98, TA100, TA102 y TA104. Sin embargo inicialmente también estaba planificado evaluarlas mediante el ensayo SMART, pero el principal problema ha sido la cantidad de muestra disponible para realizar las evaluaciones.

De las tres fases se ha determinado que la fase media es la que presenta mayor toxicidad (2%, 3% y 4% v/v), seguida de la fase superior (10%, 15% y 20% v/v), y finalmente la fase inferior (50%, 60% y 70% v/v).

Las evaluaciones se han realizado teniendo desconocimiento de la caracterización química de cada una de las fases. Los resultados han demostrado que las fases superior e inferior no producen mutagenicidad en ninguna de las cuatro cepas de *Salmonella*. Sin embargo las cepas TA98 y TA102 detectan efectos mutagénicos producidos por la fase media.

Estos resultados tienen cierta relación con los obtenidos en la evaluación de la mezcla sin fraccionar, donde se demostró que este líquido produce mutagenicidad en tres cepas TA98, TA100 y TA102. Sin embargo cuando se realiza el fraccionamiento se demuestra que solo las cepas TA98 y TA102 son sensibles. Con estos resultados se demuestra que es importante valorar mezclas químicas en su conjunto. El fraccionamiento puede ser un indicador importante para identificar la fase más peligrosa, pero está claro que el efecto de una mezcla no puede ser explicado solo por una valoración de sus fracciones y tampoco por una valoración individual de sus componentes.

Para finalizar caracterización de los líquidos de pirólisis ha identificado que las fases superior y media están conformadas por hidrocarburos, siendo los HPAs los principales integrantes de la fase media y la fase inferior que es de característica acuosa, está conformada por una serie de compuestos nitrogenados, por este motivo, laboratorios químicos en los que se valorizan estos líquidos, consideran que potencialmente pueden ser empleados para enmendar suelos. Por este motivo se ha decidido someter a la fase inferior de los 6 líquidos de pirólisis a estudios de ecotoxicidad.

Primero se ha empleado el ensayo de germinación en semillas de *L. sativum*. La primera dificultad que se ha encontrado, fue la elevada toxicidad. Inicialmente se evaluaron concentraciones de 100%, 50%, 25%, 10% y 5% (v/v) para los 6 líquidos, observándose una inhibición total de la germinación. En una segunda prueba, se bajaron las concentraciones a 1%, 0.5%, 0.1% y 0.05% (v/v), se observó la fase inferior de los 6 líquidos de pirólisis presentan índices de germinación inferiores al 50%, lo que indica que esta tienen elevados efecto fitotóxicos.

En segundo lugar se ha empleado el ensayo de inhibición de la luminiscencia en *V. fischeri*. Para determinar las concentraciones de evaluación, se ha utilizado como referencia el ensayo de *L. sativum*, sin embargo dichas concentraciones resultaban tóxicas. Por tal motivo, fue necesario reducir aún más las concentraciones de evaluación, llegando a valorar entre 0.013% y 0.16% (v/v) para los 6 fases inferiores. En todos los casos se ha podido determinar el valor CE50 obtenido a los 30 minutos de exposición, como se muestra continuación: líquido de origen urbano-Valladolid, 0.065 (530°C y 650°C) > 0.080 (450°C); líquido de origen industrial-Madrid, 0,029 (530°C) > 0,067°C (450°C) > 0,094 (650°C). Se puede apreciar que en ambos casos los líquidos obtenidos a 530°C son los de mayor toxicidad.

Estos resultados muestran que se debe reconsiderar la potencial aplicación que se le quiere dar a la fase inferior de los líquidos de pirólisis. Aunque químicamente demuestren poseer compuestos que podrían favorecer las características nutritivas del suelo, no se puede dejar de lado, el hecho de haber demostrado que son mezclas con elevados niveles de toxicidad lo cual supone un riesgo ambiental.

La bibliografía científica de la valoración de ecotóxica de estas mezclas complejas es limitada, de hecho los resultados de esta tesis, son los primeros que dan a conocer los efectos ecotóxicos con el empleo de los ensayos de *L. sativum* y *V. fischeri*. Existen otros estudios como los de Girad y Blin (2005) que determinaron que a bajas concentraciones, los líquidos de pirólisis afectan los procesos de fertilización, pueden producir eutrofización por lixiviación (aunque no de gran magnitud debido a la baja concentración de nitrógeno y minerales), inhiben el crecimiento de las algas *Scenedesmus subspicatus* y *Pseudokirchneriella subcapitata* y producen inmovilidad en *Daphnia magna*, cuando las concentraciones de exposición son de 1, 10 y 100 mg/L.

Discusión

Otros estudios demostraron que los líquidos de pirólisis no son tóxicos vía oral en ratas, después de una exposición de 7 días a 1500 mg/Kg/día. Aunque se ha observado que durante las primeras horas de ingesta, se produce hipoactividad y temblores que posiblemente están asociados a estrés (Blin y col, 2005).

Estudios de toxicidad cutánea en ratas y conejos demuestran los líquidos de pirólisis producen decoloración de la piel, sequedad y lesiones, como hinchazones (Blin y col., 2005).

Tomando en cuenta todos los resultados de esta tesis, se puede concluir que la exposición a mezclas complejas como son aquellas aplicadas en agricultura o destinadas a la valorización energética, tienen la capacidad de producir efectos ecotóxicos, mutagénicos y genotóxicos, principalmente aquellos que se obtienen después de la valorización. Así mismo se ha comprobado que la aplicación de una batería de ensayos en el que se emplean bacterias, especies vegetales y animales no mamíferos permiten obtener una valoración completa de los efectos que puede producir la exposición a mezclas complejas. Este trabajo también demuestra que es necesario el empleo de bioensayos para complementar los estudios de caracterización química, ya que se ha demostrado que cuando los compuestos ingresan al organismo, se producen una serie de interacciones como sinergismo o antagonismo y que de ello dependerá el efecto tóxico final.

Finalmente, ensayos alternativos a la experimentación animal que sean sensibles, rápidos y económicos son una buena opción a la hora de cumplir con el principio de precaución en toxicología: “Es mejor saber que un compuesto o mezcla no es tóxica, a ignorar que un compuesto o mezcla es tóxica”.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. Las mezclas complejas relacionadas con la agricultura (lixiviados de suelos enmendados con lodos de depuradora, suelos enmendados con lodo secado térmicamente, lodo compostado y compost RSU), no tienen la capacidad de ejercer efectos ecotóxicos en *Lepidium sativum* y *Vibrio fischeri*, mutagénicos en *Salmonella typhimurium*, ni genotóxicos en *Drosophila melanogaster*.
2. Las mezclas complejas empleadas como materia prima para la obtención de productos con alto valor energético (lodos procedentes de estaciones depuradoras urbana-Valladolid e industrial-Madrid) son ecotóxicas para *Lepidium sativum*, pero no mutagénicas ni genotóxicas.
3. Las mezclas complejas obtenidas de la valorización de lodos de depuradora, líquidos de pirólisis obtenidos a 450 °C, demuestran que no tienen la capacidad de producir efectos mutagénicos en *Salmonella typhimurium*, pero si efectos genotóxicos en *Drosophila melanogaster*.
4. Los líquidos de pirólisis obtenidos a 530°C y 650°C demuestran que tienen efectos mutagénicos en *Salmonella typhimurium* y genotóxicos en *Drosophila melanogaster*.
5. Los métodos alternativos de genotoxicidad *Drosophila melanogaster*, de mutagenicidad en *Salmonella*/microsoma y de ecotoxicidad de germinación de semillas de *Lepidium sativum* e inhibición de luminiscencia en *Vibrio fischeri*, demuestran ser ensayos simples, sensibles, rápidos y económicos para evaluar el efecto tóxico potencial de una determinada mezcla compleja; y brindan información valiosa de los efectos biológicos que frecuentemente no son detectados en la caracterización físico-química.
6. Este conjunto de métodos alternativos a la experimentación animal, constituye una estrategia de evaluación toxicológica, que debe

realizarse previa al uso agrícola de las mezclas y en la valorización de estas; todo ello, contribuye al bienestar de la salud humana y el ambiente.

7. Bibliografía

- Abbondanzi, F., Cachada, A., Campisi, T., Guerra, R., Raccagni, M., Iancondini, A. 2003. Optimization of a microbial bioassay for contaminated soil monitoring: bacterial inoculum standardization and comparison with Microtox® assay. *Chemosphere*. 53: 889-897.
- Acosta, Y., Paollini, J., Benítez, E. 2004. Índice de humificación y prueba de fitotoxicidad en residuos orgánicos de uso agrícola potencial. *Rev. Fac. Agron.* 21(4): 185-194.
- Adler, I.D., Ashby, J., Würgler, F.E. 1989. Screening for possible human carcinogens and mutagens: a symposium report. *Mutat. Res.* 213: 27-39.
- Aguayo, S. 2002. Valoración Sanitaria-Ambiental de efluentes y vertidos al medio acuático. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. 193p.
- Aguayo, S., Muñoz, M.J., De la Torre, A., Roseta, J., de la Peña, E., Carballo, M. 2004. Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Sci. Total Environ.* 328: 69–81.
- Albaladejo, R., Villanueva, R., Ortega, P., Astasio, P., Gil, A., Granados, B., Calle, E., Domínguez R. 1995. Evaluación de la actividad mutagénica de aguas de consumo público por medio del test de ames. *Rev. Esp. Salud Pública*. 69: 393-408.
- Alonso-Moraga, A., Graf, U. 1989. Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis*. 4: 105-110.
- Allué E., Guerrero F., Masaguer A., Gascó J.M. 1994. Aplicación del compost de residuos sólidos urbanos a suelos de cultivo de viñedo y de cereal en la Comunidad Autónoma de Madrid. Actas del III Congreso Internacional de la ANQUE. Puerto de la Cruz, Tenerife. 1:159-168.
- Altenburger, R. y Greco W.R. 2009. Extrapolation concepts for dealing with multiple contamination in environmental risk assessment. *Integr Environ Assess Manag*. 5: 62-68
- Alveranga, P., Palma, P., Conçalves, A.P., Fernández, R.M., Cunha-Queda, A.C., Duarte, E., Vallini, G. 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environ.Int.* 33: 505-513.
- Alveranga, P., Palma, P., Conçalves, A.P., Baiao, N., Fernández, R.M., Varennes, A. 2008. Assessment of chemical biochemical and ecotoxicological aspects in a mine soil amended with sludge of either urban or industrial origin. *Chemosphere*. 72: 1774-1781.

Bibliografía

- Amador-Muñoz, O., Delgado, A., Villalobos, R., Munive, Z., Ortiz, R., Diaz, G., Bravo, J., Gomez, S. 2001. Partículas supendidad, hidrocarburos aromáticos policíclicos, y mutagenicidad en el sur este de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 17(4): 193-204.
- Amaral, V., Medina da Silva, R., Reguly, M.L., Rodrigues de Andrade, H. 2005. *Drosophila* wing spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat. Res.* 583: 67-74.
- Amaral, V., Sinigaglia, M., Reguly, M.L., Rodrigues de Andrade, H. 2006. Genetic toxicity in surface water from Guaíba hydrographic region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* wing spot test. *Environ. Pollut.* 139: 469-476.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D. 1973. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activations and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of science of USA*. 69: 3128 – 3132.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31: 347-364.
- Aportela, P., Gonzales, Y., Marcos, E., Pérez, I., Rodríguez, S., Brown, A. 2006. Evaluación de la toxicidad de un lodo anaerobio en plantas terrestres. En: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEuVVuuAVVEIPjVMha.php> Código ISPN EEVVUUAVVEIPJVMHA.
- Araki, A., Noguchi, T., Kato, F., Matsushima, F. 1994. Improved method for by using a gas sampling bag. *Mutat. Res.* 307:335-344.
- Aramba, M., Bjelic, S., Subakov, G. 1995. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L., and *Daphnia magna* St.: comparative investigations and the practical applications. *Water Res.* 29(2): 497-503.
- Arienzo, M., Christen, E., Quayle, C. 2009. Phytotoxicity testing of winery wastewater for constructed wetland treatment. *J. Hazard. Mater.* 169: 94-99.
- Auerbach, C., Robson, J.M. 1947. The production of mutations by chemical substances. *Proc. R. Soc. Edinb. Biol.* 62: 271-283.
- Ayuso, M., Pascual, J., García, C., Hernández, T. 1996. Evaluation of urban wastes for agricultural use. *Soil. Sci. Plant. Nutric.* 42: 105-111.

- Azuara, M., Fonts, I., Juan, A., Gea, G., Murillo, M.B. 2008. Properties of diesel-like liquid obtained from pyrolysis of sewage sludge in a bubbling fluidized bed. 16th European Biomass Conference & Exhibition. ETA-Renewable Energies and WIP-Renewable Energies, (Valencia).
- Babish, J.G., Johnson, B., Lisk, D. 1983. Mutagenicity of municipal sewage sludges of American cities. *Environ. Sci. Technol.* 17(5):272–277.
- Baden, J.M., Brinkenhoff, M., Wharton, R.S., Hitt, B.A., Simmon, V.F., Mazze, R.I. 1976. Mutagenicity of volatile anesthetics: halothane. *Anesthesiology*. 45:311-318.
- Baden, J.M., Kelly, M., Simmon, V.F., Rice, S.A., Mazze, R.I. 1978. Fluoxene mutagenicity. *Mutat. Res.* 58:183-191.
- Barber, E.D., Donish, W.H., Mueller, K.R. 1981. A procedure for the quantitative measurement of the mutagenicity of volatile liquids in the ames *Salmonella*/microsoma assay. *Mutat. Res.* 90:31-48.
- Barber, E.D., Donish, W.H., Mueller, K.R. 1980. Quantitative measurement of the mutagenicity of volatile liquids in the Ames *Salmonella*/microsome assay. *Environ. Mutagen.* 2:307.
- Barrueco, C. 1986. Estudio del captan y compuestos relacionados mediante el enesayo bacteriano con mutantes de *Salmonella typhimurium*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. 541p.
- Barrueco, C., Herrera, A., de la Peña, E. 1991. Mutagenic evaluation of trichloroforn using different assay methods with *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis* 6:71-76.
- Bayo, J., Angosto, J.M., Gómez-López, M.D. 2009. Ecotoxicological screening of reclaimed disinfected wastewater by *Vibrio fischeri* bioassay after a chlorination -dechlorination process. *J. Hazard. Mater.* 172: 166-171.
- Baud-Grasset, F., Baud-Grasset, S., Safferman, S. 1993. Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity Test. *Chemosphere* 26(7): 1365-1374.
- Bello, J., López, A. 2001. Fundamentos de ciencia Toxicológica. Diaz-Santos. 1era ed. España. 349p.
- Beck, A.J., Johnson, D.L., Jones, K.C. 1996. The form and bioavailability of non-ionic chemicals in sewage sludge-amended agricultural soils. *Sci. Total Environ.* 185: 125-149.

Bibliografia

- Bernardo, M., Lapa, N., Barbosa, R., Gonçalves, M., Mendes, B., Pinto, F., Gulyurtlu, I. 2009. Chemical and ecotoxicological characterization of solid residues produced during the co-pyrolysis of plastics and pine biomass. *J. Hazard. Mater.* 166: 309-317.
- Bernardo, M., Lapa, N., Gonçalves, M., Barbosa, R., Mendes, B., Pinto, F., Gulyurtlu, I. 2010. Toxicity of char residues produced in the copyrolysis of different wastes. *Waste Manage.* 30: 628-635.
- Berti, W.R., Jacobs, L.W., 1996. Chemistry and phytotoxicity of soil trace elements from repeated sewage sludge applications. *J. Environ. Qual.* 16, 438–442.
- Bispo, A., Jourdain, M.J., Jauzein, M. 1999. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Org. Chem.* 30:947-952.
- Blevins, R.D., Brennan, L.A. 1990. Fate of mutagenic activity during conventional treatment of municipal wastewater sludge. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 657-664.
- Blin, J., Girard, P., Volle, G. 2005. *Bio-oil toxicity assessment versus pyrolysis parameters*. PyNe Handbook. A.V. Bridgwater, CLP press UK. 3: 95-104.
- Boyd, J.N., Stoewsand, G.S., Babish, J.G., Telford, J.N., Lisk, D.J. 1982. Safety evaluation of vegetables cultured on municipal sewage sludge-amended Soil. *Arch. Environm. Contain. Toxicol.* 11:399-405.
- Brain, R., Johnson, D., Richards, S., Hanson, M., Sanderson, H., Lam, M., Young, C., Mabury, S., Sibley, P., Solomon, K. 2004. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquat. Toxicol.* 70: 23-40.
- Brem, A., Stein, B., Rosenkxanz, H.S. 1974. The mutagenicity and DNA-modifying effect of haloalkanes. *Cancer Res.*, 34: 2576--2579.
- Bridges, B.A. 1978. On the detection of volatile liquid mutagens with bacteria: experiments with dichlorvos and epichlorhydrin. *Mutat. Res.* 54: 367-371.
- Brown, K.W., Donnelly, K.C., Thomas, J.C., Pavol, P. 1985. Mutagenicity of three agricultural soils. *Sci. Total Environ.* 41: 173-186.
- Brown, K.W. Donnelly, K.C., Thomas, J.C., Davol, P. 1986. Mutagenic activity of soils amended with two refinery wastes. *Water, Air, Soil Pollut.* 29 (1986) 1-13.

- Brusik, D.J. 1987. *Principles of genetic toxicology*. Chapter 1. Origins of genetic toxicology pp 1-11. Chapter 4. Screening chemicals for genotoxic properties, 2nd edition. Plenum Press. New York. 79-120.
- Bünger, J., Krah, J., Baum, K., Schröder, O., Müller, M., Westphal, G., Ruhnau, P., Schütz, T.G., Hallier, E. 2000. Cytotoxic and mutagenic effects, particle size and concentrations analysis of the diesel engine emissions using biodiesel and petrol diesel as fuel. *Arch. Toxicol.* 74: 490-498.
- Bünger, J., Krah, J., Munack, A., Ruschel, Y., Schröder, O., Emmert, B., Westphal, G., Müller, M., Hallier, E., Brüning, T. 2007. Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. *Arch. Toxicol.* 81: 599-603.
- Burriel, F., Hernando, V. 1950. El fósforo en los suelos españoles. V. Nuevo método para determinar el fósforo asimilable en los suelos. *An. Edafol. Agrobiol.* 9: 611-622.
- Cape, J.N. 2003. Effects of airborne volatile organic compounds on plants. *Environ. Pollut* 122: 145–157.
- Carballo, M., Aguayo, S., Roset, J., de la Peña, E., de la Torre, A., Muñoz MJ. 2002. Valoración de las aguas residuales mediante procedimientos analíticos y biológicos. *Rev. Salud Ambient.* 2(1): 32-38.
- Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babín, M.M., Fernández, C., Alonso, F., Tarazona, J.V. 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotox. Environ. Saft.* 72:1309–1319.
- Cadahía, C., Lucena, J. J. 1998. Diagnóstico de nutrición y recomendaciones de abonado. En: Cadahía, C. (Ed.), *Fertirrigación. Cultivos hortícolas y ornamentales*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 173-246.
- Callahan, C.A., Menzie, C.A., Burmaster, D.E., Wilborn, D.C., Ernst, T. 1991. On-site methods for assessing chemical impact on the soil environment using earthworms: a case study at the Baird and McGuire Superfund site, Holbrook, Massachusetts. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 817-826.
- Carmona, E., Kossatz, E., Creus, A., Marcos, R. 2008. Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the *Drosophila* wing spot test. *Chemosphere* 70: 1910–1914.
- Carmona, E. 2009. Evaluación genotóxica de algunos metales pesados en *Drosophila melanogaster* mediante ensayos SMART de alas y cometa. Tesis Doctoral. Universidad

Bibliografía

Autónoma de Barcelona, Facultad de Biociències, Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Mutagènesi. 169p.

Castaneda, M., Duenas, E., Guzmán, J. 1994. Valoración genotóxica del fenobarbital en las cruzas AB y E de la prueba SMART en *Drosophila melanogaster*. XX Coloquio de Investigación. UNAM.

Celis, J., Sandoval, M., Zagal, E., Briones, M. 2006. Efecto de La adición de biosólidos urbanos y de salmonicultura sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en un suelo patagónico. *R.C. Suelo Nutr. Veg.* 6(3): 13-25.

Celis, J., Sandoval, M., Briones, M. 2007. Bioensayos de fitotoxicidad de residuos orgánicos en lechuga y ballica anual realizados en un suelo alfisol degradado. *R.C. Suelo Nutr. Veg.* 7(3): 51-60.

Claxton, L., Houk, V., Hughes, T. 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 410: 237-243.

Cleuvers, M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 142: 185–194.

Cleuvers, M. 2004. Chronic Mixture Toxicity of Pharmaceuticals to *Daphnia* – The Example of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. En: Kümerer, K. *Pharmaceuticals in the environment*. Third edition. ISBN: 978-3-54074663-8.

Clevenger, T.E., Hempill, D.D., Roberts, K., Mullins, W.A. 1983. Chemical composition and posible mutagenicity of municipal sludges. *J. Water Pollut. Control Fed.* 55(12):1470-1475.

Cornejo, S. 2001. *Estimación de riesgo por consumos de productos tratados con plaguicidas*. Primera Edición. México. Editorial Mexico. 53p.

Costa, F., García, C., Hernández, T., Polo, A. 1991. Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Centro de Edafología y Biología Aplicada. Murcia. España. 181p.

Courty, B., Le Curieux, F., Milon, V., Marzin, D. 2004. Influence of extraction parameters o the mutagenicity soil samples. *Mutat. Res.* 565: 23-34.

Coz, A., Andrés, A., Irabien, A. 2004. Ecotoxicity assessment of stabilized/solidified foundry sludge. *Environ, Sci. Technol.* 38(6): 1897-1900.

- Christofi, N., Aspichueta, E., Dalzell, D., De la Sota, A., Etxebarria, J., Fernández, T., Gutierrez, M., Morton, J., Obst, U., Schmellenkamp, P. 2001. Congruence in the performance of model nitrifying activated sludge plants located in Germany, Scotland and Spain. *Water Res.* 37: 177–187.
- Danielson, P.B., MacIntyre, R.J., Fogleman, J.C. 1997. Molecular cloning of a family of xenobiotic inducible *drosophila* cytochrome P450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:10797–802.
- Danielson, P.B., Foster, J., McMahon, M., Smith, M., Fogleman, J.C. 1998. Induction by alkaloids and phenobarbital of Family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Mol. Gen. Genet.* 259:54–9.
- Darvodelsky, P., Fien, M. 2005. The health impacts of biosolids use on land. *Water* 21. December, 20-22.
- de la Peña, E. Guadaño, A. 2000. Evolution and coordination of the alternative methods in Spain. *Sci. Tot. Environ.* 247: 333-335.
- de la Peña, E., Herrero, O. 2005. Evaluación toxicológica de residuos orgánicos. *Rev. Salud Ambient.* 5(2): 141-151.
- de Moraes, S., Alcántara, A., Hora, J., Pavanin, L., Graf, U., de Rezende, A., Bueno, B., Fragiorge, E. de Souza, N.C., Gutierrez, R., Spanó, A. 2007. Assessing the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. *Environ. Mol. Mutagen.* 48(2): 96-105.
- Directiva 86/278/CEE del Consejo, de 12 de junio de 1986, relativa a la protección del medio ambiente y, en particular, de los suelos, en la utilización de los lodos de depuradora en agricultura (DOCE n° L 181 de 04/07/1986)
- Directiva 91/271 CEE. Directiva del Consejo de la Comunidad Económica Europea de 21 de mayo de 1991 sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas.
- Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Dean, B. 1985. Recent finding on the genetic toxicology of benzene, toluene, xilenes and phenols. *Mutat. Res.* 154: 153-181.

Bibliografía

- DeLorenzo, M.E., Keller, J.M., Arthur, C.D., Finnegan, M.C., Harper, H.E., Winder, V.L., Zdankiewicz, D.L. 2008. Toxicity of the antimicrobial compound triclosan and formation of the metabolite methyl-triclosan in estuarine systems. *Environ. Toxicol.* 23: 224–232.
- Dihl, M., Bereta, M., do Amaral V., Lehmann, M., Reguly, ML., Rodrigues. de Andrade H. 2008. Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons are inducers of mitotic homologous recombination in the wing-spot test of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 46: 2344–2348.
- Delgado-Rodrigues, A., Ortíz-Martelo, R., Graf, U., Villalobos-Petrini, R., Gomez-Arroyo, S. 1995. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 341: 235-247.
- Delgado-Rodrigues, A., Martello, O., Villalobos, P, and Arrollo, G., Graf, U. (1999) Genotoxicity of organic extract of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*. 39: 33-43.
- De Meester, C., Poncelet, F., Roberfroid, M., Mercier, M. 1980. The mutagenicity of butadiene towards *Salmonella typhimurium*. *Toxicol. Lett.* 6:125-130.
- Devare, M., Bahadir, M. 1994. Biological monitoring of landfill leachate using plants and luminiscent bacteria. *Chemosphere* 28(2): 261-271.
- Devesa-Rey y col., 2008 Fractionation and Bioavailability of Arsenic in the Bed Sediments of the Anllóns River (NW Spain). *Water Air Soil Pollut* (2008) 195:189–199.
- Distlerath, L., Loper, J., Dey, C. 1984. Aliphatic halogenated hydrocarbons produce volatile *Salmonella* mutagens. *Mutat. Res.* 136: 55-64.
- Djalali-Behzad, G., Hussain, S., Osterman-Golkar, S., Segerbick, D. 1981. Estimation of genetic risks of alkylating agents. VI. Exposure of mice and bacteria to methyl bromide. *Mutat. Res.* 84:1-9
- DRACE Medioambiente. Empresa para el tratamiento de Agua Residuales. Disponible en <http://www.dracemedioambiente.com> (último acceso 20 de Mayo 2009)
- Dube, M.F., Green, C.R. 1982. Methods of collection of smoke for analytical purposes. *Recent Adv Tob Sci* 8: 42-102.

- Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y., Goto, K., Hirata K., Miyamoto, K., Yoshimura, H. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*. 57:1733-1738.
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P. 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)-contaminated soil. *Ecotox. Environ. Safe*. 67: 190–205.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J. 2002. Methods of *in vitro* toxicology. *Food. Chem. Toxicol*. 40: 193-236.
- European Commission Scientific and Technical Subcomponent Report (2001) Disposal and recycling routes for sewage sludge. European Commission DG Environment B/2, ISBN 92-894-1801-1, 121pp.
- Escher, B., Bramaz, N., Quayle, P., Rutishauser, S., Vermeirssen, E. 2008. Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface Waters using a mode-of-action based test battery. *J. Environ. Monit*. 10: 622-631.
- Fang, M., Wong, J.W.C. 1999. Effects of lime ammendment on availability of heavy metals and maturation in sewage sludge composting. *Environ. Pollut*. 106: 83-89.
- Farre, M., Barceló, D. 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassay and chemical analysis. *Trends. Anal. Chem*. 22(5): 299-310.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H. 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol*. 56, 13–32.
- Fernández-Alba, A.R., Hernando, M.D., Piedra, L., Chisti, Y. 2001. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute bioassays. *Anal. Chim. Acta*. 456: 303-312.
- Fernández-Alba, A. R., Hernando Guil, L., Díaz López, G., Chisti, Y. 2001. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Anal. Chim. Acta*. 426, 289-301.
- Feron, V. J., Groten, J. P., van Bladeren, P. J. 1998. Exposure of humans to complex chemical mixtures: hazard identification and risk assessment. *Arch. Toxicol*. 363-377.

Bibliografía

- Feron, V.J., Groten, J.P. 2002. Toxicological evaluation of chemical mixtures. *F. Chem. Toxicol.* 40: 825-839.
- Fishbein, L. 1976. Industrial mutagens and potential mutagens, I. Halogenated aliphatic derivatives. *Mutat. Res.* 32:267-308.
- Fjälborj, B., Ahlberg, G., Nilsson, E., Dave, G. 2005. Identification of metal toxicity in sewage sludge leachate. *Environ. Int.* 31:25-31
- Fonts, I., Azuara, M., Gea, G., Murillo, B. 2009. Study of the pyrolysis liquids obtained from different sewage sludge *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 85: 184–191.
- Fragiorge, E., Azenha, A., Graf, U., Spanó, M.A. 2008. Comparative genotoxicity evaluation of imidazoles herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 46: 393-401.
- Frantz, S.W, Sinsheimer, J.E. 1981. Bacterial mutagenicity and toxicity of cycloaliphatic epoxides. *Mutat. Res.* 90:67-78
- Frei, F., Würgler, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203: 297-308.
- Frei, H., Würgler, F.E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 344: 247-258.
- Frölich, A., Würgler, F.E. 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test, *Mutat. Res.* 216: 179–187.
- Frölich, A., Würgler, F.E. 1990a. *Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.* 234: 71–80.
- Frölich, A., Würgler, F.E., 1990b Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat. Res.* 244:201–208.
- Fuentes, A., Lloréns, M., Saéz, J., Aguilar, M.I., Ortuño, J., Meseguer, V.F. 2004. Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilized sewage sludges. *J. Hazard. Mat.* 108(3) 161-169.

- Fuentes, A., Llorens, M., Saenz, J., Aguilar, M.I., Pérez-Marín, A.B., Ortuño, J.F., Meseguer, V.F. 2006, Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. *Environ. Pollut.* 143:355-360.
- Fujikawa, K., Kondo, S. 1986. DNA repair dependence of somatic mutagenesis of transposon caused white alleles in *Drosophila melanogaster* after treatment with alkylating agents. *Genetics* 112: 505-522.
- Fullana, A. 2001. Pirólisis y combustión de neumáticos usados y lodos de depuradora. Tesis doctoral en Ingeniería química. Departamento de Ingeniería química. Universidad de Alicante.
- Galdós, A. 2001. Secado térmico y cogeneración: Perspectivas". XXI Jornadas Técnicas de la AEAS.
- García-Gil, J.C. 2001. Efectos residuales y acumulativos producidos por la aplicación de compost de residuos urbanos y lodos de depuradoras sobre agroecosistemas mediterráneos degradados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.. 284 pp.
- Gong, P., Wilke, B.M., Strozzi, E., Fleischmann, S. 2001. Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment of soils. *Chemosphere*. 44:491-500.
- Gouider, M., Feki, M., Sayadi, S. 2010. Bioassay and use in irrigation of untreated and treated wastewaters from phosphate fertilizer industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 932–938.
- Graf, U., Green, M.M., Würgler, F.E. 1979. Mutagen-sensitive mutants in *Drosophila melanogaster*; effects on premutational damage. *Mutat. Res.* 63: 101-112.
- Graf, U., Juon, H., Katz, A.J., Frei, H.J., Würgler, F.E. 1983. A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat. Res.* 120: 233-239.
- Graf, U. 1984. *Drosophila* as a model for genetic toxicology. *Inmun. Hematol. Res.* 3: 203-206
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutag.* 6: 153-188.
- Graf, U., vanSchaick. 1992. Improved High Bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test. *Mutat. Res.* 271: 59-67.

Bibliografía

- Guzella, L. 1998. Comparison of the test procedures for sediment toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere* 37(14): 2895-2909.
- Hällström, I., Grafström, R. 1981. The metabolism of drugs and carcinogens in isolated subcellular fractions of *Drosophila melanogaster* . II. Enzyme induction and metabolism of benzo[a]pyrene. *Chem. Biol. Interact.* 34:145-159.
- Harrington, Jr.WM. 1978. Hazardous solid waste from domestic wastewater treatment plants. *Environ Health Perspect.* 27:231-237.
- Hernandez, T., García C., Costa F., Valero J.A., Ayuso M. 1992. Utilización de residuos urbanos como fertilizantes orgánicos. *Suelo y Planta* 2:373-383.
- Herrero, O. 2008. Evaluación in vitro del potencial mutagénico y citotóxico del di(2-etilhexil) ftalato. Trabajo de Diploma de Estudios Avanzados. Universidad Autónoma de Madrid.
- Herrero, O., Fernández, J.M., Hernández, D., Montes, P., Polo, A., de la Peña, E. 2005. Mutagenicidad y Ecotoxicidad de enmiendas orgánicas de suelos. *Rev. Toxicol.* 22:60-64.
- Herwijnen, R., Laverye, T., Poole, J., Hodson, J., Hutchings R. 2007. The effect of organic materials on the mobility and toxicity of metals in contaminated soils. *Applied Geochemistry* 22 (2007) 2422–2434.
- Hopke, P.K., Plewa, M.J, Jhonston, J.B., Weaver, D., Wood, S.G., Larson, R.A., Hinesly, T. 1982. Multitechnique screening of chicao municipal sewage sludge for mutagenicity activity. *Environ.sci. Technol.* 16 (3):140-147.
- Hughes, T., Simmons, D., Monteith, L., Claxton, L. 1987. Vaporization technique to measure mutagenic activity of volatile organic chemical in the Ames/*Salmonella* assay. *Environ. Mutagen.* 9: 421-441
- IARC (1987) Benzene. Monografías IARC 29 suppl. 7
- IARC (2002a) Styrene. Monografias IARC 60 Suppl. 82
- IARC (2002b) Naphthalene Monografías IARC 60 Suppl. 82
- IARC (s/a) Anthanthrene 7(92) en preparación.
- IARC (s/a) Indeno. Monografías IARC 32, Suppl. 7

- Inguanzo, M. 2004. Valorización energética y medioambiental de los lodos de EDARs mediante pirólisis. Tesis doctoral, Departamento de Ingeniería Química y Tecnológica del medio ambiente. Universidad de Oviedo.
- ISO11348-3. Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria.
- Jacocucinas, Vicedo, L., Rodrigues, R., Lehman, M., Reguly, ML., Rodrigues de Andrade, H. 2010. Recombinogenic activity of water and sediment from Sinos River and Araça and Garças streams (Canoas, Brazil), in the *Drosophila* wing spot test. *Sci. Tot. Environ.* 408: 571-577.
- Jolibois, B., Guebert, M. 2005. Efficacy of two wastewater treatment plants in removing genotoxins. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 9–295.
- Jolibois, B., Guerbert, M., Vassal, S. 2003. Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS shromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere* 51: 539-543.
- Jos, A., Repetto, G., del Peso, A., Salguero, M, Hazen, MJ., Molero, ML., Fernandez-Freire, P., Perez-Martin, JM., Labrador, V., Camean, A. 2005. Ecotoxicological evaluation of additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints. *Aquat. Toxicol.* 71: 183-192.
- Jos, A., Repetto, G., Rios, JC, Hazen, MJ, <molero, M., del peso, A., Salguero, M., Fernández-Freire, P., Perez-Martin JM., Camen, A. 2003. Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. *Toxicol. In Vitro.* 17: 525-532.
- Iyehara, H., Shibahara, T., Iwata, H., Okada, T., Tsuruta, S., Kakimoto, K., Sakata, K., Kato, Y., Ryo, H., Itoh, T., Fujikawa, K. 1994. Genotoxic activities in vivo of cobaltous chloride and other metal chlorides as assayed in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 320: 133-140.
- Kado, N.Y, Langley, D., Eisenstadt, E. 1983. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat Res.*121(1):25-32
- Karekar, V., Joshi, S., Shinde, S.L. .2000. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 468: 183-194.

Bibliografía

- Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9: 527-549.
- Katsoyiannis, A., Samara, C. 2007. Ecotoxicological evaluation of the wastewater treatment process of the sewage treatment plant of Thessaloniki, Greece *J. Hazard. Mat.* 141: 614-621.
- Kaya, B., Yaniko, A., Creus, A., Cabré, O., Marcos, R. 2000. Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environ. Mol. Mutagen.* 36: 40-46.
- Kaya, B., Marcos, R., Yaniku, A., Creus, A. 2004. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutat. Res.* 557: 53-62.
- Kiss, K.G., Encarnación, A.G. Los productos y los impactos de la descomposición de residuos sólidos urbanos en los sitios de disposición final. Instituto nacional de ecología en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/gacetitas/497/kiss.html>
- Klee, N., Gustavsson, L., Kosmehl, T., Engwall, M., Erdinger, L., Braunbeck, T., Hollert, H. 2004. Changes in toxicity and genotoxicity of industrial sewage sludge samples containing nitro- and amino-aromatic compounds following treatment in bioreactors with different oxygen regimes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11(5):313-20.
- Knize, M., Takemoto, B., Lewis, P., Felton, J. 1987. The characterization of the mutagenic activity of soil. *Mutat. Res.* 192: 23-30.
- Kounatidis, I., Papoti, V., Nenadis, N., Franzios, Oikonomu, M., Partheniou, F., Tsimidou, M., Mavragani-Tsipidou, P. 2009. Evaluation of potential genotoxicity of virgin olive oil (VOO) using the *Drosophila* wing spot test. *J. Agric. Food. Chem.* 57: 7785-7789.
- Kortenkamp, A. 2007. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 115: 98-105.
- Kramers, P.G., Kramers, H.C. Mout, B. Bissumbhar, C.R. Mulder. 1991. Inhalation exposure in *Drosophila* mutagenesis assays: experiments with aliphatic halogenated hydrocarbons, with emphasis on the genetic activity profile of 1,2-dichloroethane. *Mutat. Res.* 252: 17-33.
- Krishnamurthi, K., Saravana, S., Hengstker, J., Hermes, M., Kumar, K., Dutta, D., Muhil, S., Subin, S., Yadav, R., Chakrabarti, T. 2008. Genotoxicity of sludges, wastewater and effluents from three different industries. *Arch. Toxicol.* 82:965-971.

- Kristen, U. 1997. Use of higher plants as screens for toxicity assessment. *Toxicol. in vitro* 11: 181-191.
- Kungolos, A., Emmanouil, C., Tsiroidis, V., Tsiropoulos, N. 2009. Evaluation of toxic and interactive toxic effects of three agrochemicals and copper using a battery of microbiotests. *Sci. Tot. Environ.* 407: 4610-4615.
- Lapa, N., Barbosa, R., Lopes, M.H., Mendes, B., Abelha, P., Gulyurtlu, I., Santos Oliveira, J. 2007. Chemical and ecotoxicological characterization of ashes obtained from sewage sludge combustion in a fluidised-bed reactor. *J. Haz. Mat.* 147: 175-183.
- Liu, D., Chau, Y.K., Dutka, B.J. 1989. Rapid Toxicity Assessment of Water-Soluble and Water-Insoluble Chemicals Using a Modified Agar Plate Method. *Water Res.* 23:333-339.
- Lindsay, W., Norvell, W. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42: 421-428.
- Lopez, M., Grau, JM: 2004. Metales pesados, materia orgánica y otros parámetros de la capa superficial de los suelos agrícolas y de pastos de la España peninsular. INIA, Madrid.
- Lündstrom, E., Adolfsson-Erici, M., Alsberg, T., Björlenius, B., Eklund, B., Lavén, M., Breitholtz, M. 2010. Characterization of additional sewage treatment technologies: Ecotoxicological effects and levels of selected pharmaceuticals, hormones and endocrine disruptors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(7): 1612-1619.
- Mamani, P., Gonzales, M., Pillco, A., Giménez, A., Gonzales, E. 2006. Determinación genotóxica del extracto total diclorometánico de corteza de *Galipea longiflora* Krause, mediante el test de mutación y recombinación somática (SMART). *Rev. Bol. Quím.* 23(1): 53-57.
- Mantis, I., Voutsas, D., Samara, C. 2005. Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. *Ecotox. Environ. Saf.* 62:397-407.
- Manusadzianas, L., Balkelyte, L., Sadauskas, K., Blinova, I., Pollumaa, L., Kahru, A. 2003. Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotest, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquat. Toxicol.* 63: 27-41.
- Manzo, S., De Nicola F., De Luca, F., Maisto, G., Alfani, A. 2008. Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicology tests. *Chemosphere* 71: 19937-1944.

Bibliografía

- Mao, D., Lookman, R., Van De Weghe, H., Weltens, R., Vanermen, G., Bucker, N., Diels, L. 2009. Estimation of ecotoxicity of petroleum hydrocarbon mixtures in soil based on HPLC-GCXGC analysis. *Chemosphere* 77: 1508-1513.
- Margesin, R., Cimadom, J., Schinner, F. 2006. Biological activity during composting of sewage sludge at low temperatures. *Int. Biodeterioration Degradation* 57: 88-92.
- Margolin, B.H., Collings, B.J., Mason, J.M. 1983. Statistical analysis and sample-size determinations for mutagenicity experiments with binomial responses. *Environ. Mutagen* 5:705-716.
- MARM. 2009. Ministerio Español de Medioambiente, Medio Rural y Marino www.marm.es. Última visita: 15 marzo, 2011.
- Maron, D.M., Ames, B.N. 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113(3-4):173-215.
- Mathur, N., Bhatnagar, P., Mohan, K., Bakre, P., Nagar, P., Bijarna, M. 2007. Mutagenicity evaluation of industrial sludge from common effluent treatment plant. *Chemosphere* 67:1229-1235.
- Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A., Sawamura, A. 1980. Factor modulating mutagenicity in microbial test, in: K.H. Norpoth and R.C. Garner (Eds.), *Short-Term Test System for Detecting Carcinogens* Springer, Berlin. 273-285.
- McCoy, E., Burrows, L., Rosenkranz, H.S. 1978. Genetic activity of allyl chloride. *Mutat. Res.* 57:11-15.
- Mendoça, E., Picado, A., Silva, L., Anselmo, A.M. 2007. Ecotoxicological evaluation of cork-boiling wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66: 384-390.
- Miao-miao, H, Tian, G., Liang, X. 2009. Phytotoxicity and speciation of copper, zinc and lead during the aerobic composting of sewage sludge. *Journal hazardous materials* 163: 671-677.
- Mielli, A.C., Matta, M.E.M., Nersesyan, A., Saldiva, P., Umbuzeiro, G. 2009. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutat. Res.* 672:51-54
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1994. Métodos Oficiales de Análisis. Secretaría General Técnica, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

- Monarca, S., Feretti, D., Collivingnarelli, C., Guzzella, L., Zerbini, I., Bertanza, G., Pedrazzani, R. 2000. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Wat. Res.* 34(17): 4261-4269.
- Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455:29–60.
- Mphekgo, M, Cloete, T. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *Int. Biodeterioration & Biodegradation* 50 : 107 – 113.
- Müller, P., Stock, T., Bauer, S., Wolff, I. (2002) Genotoxicological characterization of complex mixtures genotoxic effects of a complex mixtures of perhalogenated hydrocarbons. *Mutat. Res.* 515: 99-109.
- Mumma, R.O., Rashid, K.A., Raupach, D.C., Shane, B.S., Scarlet-Kranz, Z.M. 1988 Mutagens, toxicants, and other constituents in small city sludges in New York State. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 17:657–663.
- Mumma, R.O., Raupach, D.R., Waldman, J.E., Hotchkiss, J.H., Gutenmannt, W.H., Bachet, C.A., Lisk, D.J. 1983. Analytical Survey of Elements and Other Constituents in Central New York State Sewage Sludges. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12:581-587.
- Nakajima, D., Ishii, R., Kageyama, S., Onji, Y., Mineki, S., Morooka, N., Takatori, K., Goto, S. 2006. Genotoxicity of microbial volatile organic compounds. *J. health Sci.* 52(2):148-154.
- Nogales, R. 1994. Efecto de los compost de R.S.U. sobre el suelo. En: Cuadernos del ICE, nº 13. Ediciones de la Universidad Autónoma de Madrid. 77-99.
- Ohe, T., White, P., DeMarini, D. 2003. Mutagenic characteristics of river waters flowing through large metropolitan areas in North America. *Mutat. Res.* 543: 101-112.
- Olajire, A., Altenburger, R., Kqster, E., Brack, W. 2005. Chemical and ecotoxicological assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon—contaminated sediments of the Niger Delta, Southern Nigeria. *Science of the Total Environment* 340 : 123– 136.
- Oleszczuk, P. 2008a. The toxicity of compost from sewage sludges evaluated by the direct contact test phytotoxkit and astracodtoxkit. *Waste. Manag.* 28:1645-1653.
- Oleszczuk, P. 2008b. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69: 496-505.

Bibliografía

- Osaba, 1995 M.L. Osaba, Detección de actividad genotóxica mediante el ensayo de mutación y recombinación somáticas en alas de *Drosophila melanogaster*. Análisis de 14 plaguicidas, Ph.D. Thesis, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain, 1995, 219p.
- Osaba, L., Rey, M.J., Aguirre, A., Alonso, A., Graf, U. 2002. Evaluation of genotoxicity of captan, maneb and zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. *Mutat. Res.* 518, 95–106.
- Osaba, L., Aguirre, A., Alonso, A., Graf, U. 1999. Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 439(1): 49-61.
- Ottaviani, M., Crebelli, R., Fuselli, S., Roca, C.L., Baldasarri, L.T. 1993. Chemical and mutagenic evaluation of sludge from a large wastewater treatment plant. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 26:18-32.
- Pancorbo, O., Cai, T., Kelley, T., Barnhart, H. 1989. Toxicity assessment of volatile organic compounds found in soil and ground water at a hazardous waste landfill site. Proceeding of the Georgia Water Resources Conference, held May 16 and 17, 1989, at The University of the Georgia. Kathryn J. Hatcher, Editor, Institute of Natural Resources, The University of Georgia, Athens, Georgia, 1989.
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A.M., Poulsen, V., Lourdain, M.J., Férard, J.F., Grand, C., Bispo, A. 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Tot. Environ.* 363: 114-125.
- Papadimitriou, C.A., Haritou, I., Samaras, P., Zouboulis, A.I. 2008. Evaluation of leaching and ecotoxicological properties of sewage sludge-fly ash mixtures. *Environ. Res.* 106: 340-348.
- Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S. 2006. A review on advantages of implementing luminiscense inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environ. Int.* 32(2): 265-269.
- Plan Nacional de Lodos de Depuradoras de Aguas Residuales 2001-2006. BOE 166. 12 julio. 2001.
- Plan Nacional Integrado de residuos 2008-2015 MARM. BOE: 49. 26 febrero, 2009.
- Perfil Ambiental de España 2008. Perfil basado en indicadores elaborado por la Subdirección General de Calidad del Aire y Medio ambiente. Ministerio de Medio Ambiente Medio Rural y Marino. ISBN: 978-84-8320-475-7

- Pérez, J.M. 2010. Evaluación *in vitro* del potencial citotóxico de mezclas de contaminantes ambientales presentes en aguas de uso humano. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 139p.
- Pérez-Sirvent, C., García-Lorenzo, M.L., Martínez-Sánchez, M.J., Navarro, M.C., Marimon J., Bech, J. 2007. Metal-contaminated soil remediation by using sludges of marble industry: Toxicological evaluation. *Environ. Int.* 33: 502-504.
- Pillco, A., Rodrigo, G. 2005. Evaluación Genotóxica y Antigenotóxica de *Baccharis latifolia*. *Acta Toxicol. Argentina* 13: 104.
- Pillco, A. 2006. Evaluación de los niveles de genotoxicidad producidos por plaguicidas aplicados en cultivos de tomate de la localidad de Caranavi – La Paz. Tesis de Magíster. Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Medicina. 135p.
- Piskorz, J., Scott, D.S., Westerberg IB (1986) Flash pyrolysis of sewage-sludge. *Ind. Eng. Chem. Process Design Develop.* 25(1):265-270.
- Plewa, M.J., Hopke, P.K. 1984. The effect of soil on the mutagenic properties of waste water. WRC Research Report 195. Unpublished report.
- Polo, A. 1991. Residuos orgánicos urbanos. Manejo y utilización. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Rahden-Staron I. 2002. The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases *in vitro* and lack of recombinagenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 518: 205–213.
- Rajapakse, N., Silava, E., Kortenkamp, A. 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual No-Observed-Effect concentrations dramatically enhances steroid hormone actions. *Environ. Health Perspect.* 110: 917-921.
- Rank, J., Nielsen, M.H. 1998. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutat Res.* 418:113–119.
- REACH. Reglamento 1907/2006 Relativo al Registro, Evaluación, la Autorización y la Restricción de Sustancias y Preparados Químicos (REACH). Diario oficial de la Unión Europea 31.5.2008.
- Real decreto 1310/1990 de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. BOE número 262 de 1/11/1990.

Bibliografía

- Red Española de Métodos Alternativos (REMA). www.remanet.net. Última visita: 20 mayo 2011.
- Ren, S. 2004. Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments. *Environ. Int.* 30: 1151-1164.
- Ren, S., Frymier, P. 2005. Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays. *Chemosphere* 58: 543-550.
- Renoux, A, Tyagi, R., Samson, R.J. 2001. Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water. Res.* 35(6): 1415–1424.
- Rizki, M. 2005. Estudio de la genotoxicidad de varios metals en *Drosophila melanogaster* utilizando el ensayo SMART de alas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Biociències, Departament de Genètica i de Microbiologia, Grup de Mutagènesi. 147p.
- Romero, P., Mendoza, A. 2008. *Ensayos toxicologicos para la evaluacion de sustancias químicas en agua y suelo*. La experiencia en México. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales. Instituto nacional de ecologia. Primera ed. México. 429p.
- Russell, W., Burch, R. 1959. The principles of humane experimental technique. Methuen publishing Ltd. (Londres).
- Samaras, P., Papadimitriou, C.A., Haritou, I., Zouboulis, A.I. 2008. Investigation of sewage sludge stabilization potential by the addition of fly ash and lime. *J. Hazard. Mat.* 154: 1052-1059.
- Salizzato, M., Pavoni, B. 1998. Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants. *Chemosphere*. 36(14): 2949-2968.
- Sartini, V.M., Nepomuceno, J.C., Pavanin, L.A. 2008. Genotoxicity of water from the paraguay river near cáceres-MT, Brazil in the *Drosophila* wing spot test. *Environ. Mol. Mutagen.* 49: 458-466.
- Selby, P.B., Olson, W.H. 1981. Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Nutr. Rev.* 83: 403-418.
- Senesi, N. 1989. Composted materials as organic fertilizers. *Sci. Total. Environ.* 81/82: 521-542.

- Shoji, R., Mohri, S., Sakai, Y., Yamada, M. 2008. Ecotoxicity assessment of sludge and leaching test eluates of sludge. *J Environ. Sci. Health A Tox Hazard Subs. Environ. Eng.* 43(9):1042-1047.
- Soler-Rovira, P. 1998. Evaluación del impacto ambiental y riesgo de contaminación producidos por la aplicación agrícola de lodos de depuradora. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Soler, P., Alonso N., Polo A. 1997. Destino de los lodos de depuradoras: un reto ante el siglo XXI. *Residuos* 38, 16-20.
- Soni, H.I., Bakre, P., Bhatnagar, P. 2008. Assment of teratogenecity and embryotoxicity of sludge from textile industries at Pali (India) in Swiss albino mice exposed during organogenetic period. *J Environ Biol.* 2008 Nov;29(6):965-9.
- Sousa, N.C., Carcalho, S., Spano, M., Graf, U. 2003. Absence of genotoxicity of a phytoterapeutic extracts from *Stryphonodendrim adstringenst* (Mart) coville in somatic germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet, Mol. Biol.* 41: 293-299.
- Spano, MA., Frei, H., Würgler, F.E., Graf, U. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16: 385–394.
- Spurgeon, D., Jones, O., Dorne, J.L., Svendsen, C., Swain, S., Stürzenbaum, S. 2010. Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures. *Sci. Tot. Environ.* 408: 3725-3734.
- Stahl, R.Jr. 1991 The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22: 94-125.
- Stettler, M, Sengstag, C. 2001 Liver carcinogen aflatoxin B₁ as an inducer of mitotic recombination in a human cell line. *Mol. Carcinog.* 31(3): 125-138.
- Szabad, J., Soós, I., Polgár, G., Héjja, G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal test. *Mutat. Res.* 113: 117-133.
- Schwarzenbach, R., Escher, B., Fenner, K., Hofstetter, T., Johnson, C., von Gunten, U., Wehrli, B. 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313: 1072–1077
- Tenenbaum, D. 1997. The beauty of biosolids. *Environ. Health Perspect.* 105 (1): 32-36.

Bibliografía

- Teuber, N., Alfaro, M., Salazar, F., Bustos, C. 2005. Sea salmon sludge as fertilizer: effects on a volcanic soil and annual ryegrass yield and quality. *Soil Use Manag.* 21: 32-434.
- Teuschler, L. 2007. Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223: 139-147.
- Tiget, N., Helvig, C., Feyereisen, H. 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 2001:189-98.
- Torres, C., Ribas, G., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R. 1992. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 280: 291-295.
- Tweats, D., Gatehouse, D. 1988. Further debate of testing strategies. *Mutagenesis.* 3(2): 95 – 102.
- U.S. EPA, (2000). EPA Program Offices for this information. 2000. USA
- Valencia, R. 1983. The versatility of *Drosophila melanogaster* for mutagenicity testing. *Ann NY Acad. Sci.* 407: 197-207.
- Valverde, J.L., Perez, J.J. 2001. Manual de toxicología ambiental forense. Centro Estudios Ramón Aréas, S.A. Madrid. 361p.
- Vogel, E.W., Sobels, F.H. 1976. The function of *Drosophila* in genetic toxicology testing. In *Chemical mutagens. Principles and Methods for their detection*. A Hollander (ed). New York, Plenum Press. 93-142.
- Vogel, E.W., Zijlstra, J.A. 1987. Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutat. Res.* 180: 189-200.
- Vogel EW, Nivard 1993. E.W. Vogel, M.J. Nivard. 1993. Performance of 181 chemicals in a *Drosophila* assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis* 8 _1993. 57-81.
- Walter, I., Martinez, F., Cala, V. 2006. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. *Environ. Pollut.* 139:507-514.
- Wesp, H.F., Tang, X., Edeharder, R. 2000. The influence of automobile exhaust on mutagenicity of soil: contamination with, fractionation, separation and preliminary identification of mutagens in the *Salmonella*/reversion assay and effects of solvent fractions on sister-chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and in the vivo mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res.* 472: 1-21.

- White, P., Claxton, L. 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res.* 567: 227-345.
- Whysner, J., Vijayaraj, M., Ross, P., Mohan, M., Lax, E. 2004. Genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mutat. Res.* 566: 99-130.
- Wilke, B., Riepert, F., Koch, C., Kühne, T. 2008. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70:283-293.
- Wijnhoven, S., Sonneveld, E., Kool, H.J. van Teiglingen, C., Vrieling, H. 2003. Chemical carcinogens induce varying patterns of LOH in mouse T-lymphocytes. *Carcinogenesis* 24: 139-144.
- Wang, Q., Ponomareva, O., Lasarev, M., Turker, M. 2006. High frequency induction of mitotic recombination by ionizing radiation in Mlh1 null mouse cells. *Mutat. Res.* 594: 189-198.
- Wong, J.W., Selvam, A. 2009. Growth and elemental accumulation of plants grown in acidic soil amended with coal fly ash-sewage sludge co-compost. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57(3):515-23
- Wong, J.W.C., Lia, K., Fanga, M., Su, D.C. 2001. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. *Environ. Int.* 27:373–380.
- Yesilada, E. 2001. Genotoxicity testing of some metals in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 66:464-469.
- Yang, KSH. 1994. Toxicology of chemical mixtures: Case studies mechanism and novel approaches. San Diego: Academic Press.
- Yousef, E.A., McConkey, J., George, D., Bruce, M., Greenberg I. 2002 Measurement of Short- and Long-Term Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Luminescent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51: 12-21.
- Zalidis, G., Stamatiadis, S., Takavakoglou, V., Eskridge, K., Misopolinos, N. 2002. Impacts of agricultural practices on soil and water quality in the Mediterranean region and proposed assessment methodology. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88: 137-146.
- Zani, C., Ferretti, D., Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., Guzzella, L., Di Caterino, F., Monarca, S. 2005. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. *Mutat. Res.* 587: 26-37.

Bibliografía

- Zimmering, S. 1992. Induced chromosome loss with nitrosopiperidine in the male *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.* 4: 521-524.
- Zordan, M., Osti, M., Pesce, M., Costa, R. 1999. Chloral Hidrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 519: 105-110.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., de Bertoldi, M. 1981a. Evaluating toxicity of Immature compost. *BioCycle*. Abril 54-57.
- Zucconi, F., Forte, M., Monaco, A., de Bertoldi, M. 1981b. Biological evaluation of compost maturity. *BioCycle*. Agosto 27-29.

Anexos

Anexo 1. Caracterización química del líquido de pirólisis Madrid obtenido a 450°C

Nº	Grupo Químico	Número CAS
Hidrocarburos Alifáticos Oxigenados		
1	2-Cyclopenten-1-one	930-30-3
2	2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	1120-73-6
3	4-Octadecenal	56554-98-4
4	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-	2758-18-1
5	Tricyclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-en-3-one	35150-63-1
6	1-Undecanol	112-42-5
7	Propanedioic acid, dipropyl ester	1117-19-7
8	2-Methyl-oct-2-enedial	38061-92-6
9	Cyclohexanebutanal, 2-methyl-3-oxo-, cis-	92485-93-3
10	1-Hexadecanol, 2-methyl-	2490-48-4
11	2,6,10,10-Tetramethyl-1-oxa-spiro[4.5]dec-6-ene	36431-72-8
12	Hexadecenoic acid, Z-11-	2416-20-8
13	Methoxyacetic acid, 4-tridecyl ester	No disponible
14	1-Hexadecanol, acetate	629-70-9
15	E-10-Octadecen-1-ol acetate	2195-92-8
16	4-Octadecenal	56554-98-4
17	Acetic acid, octadecyl ester	822-23-1
18	1-Eicosanol	629-96-9
19	Hexadecanoic acid, methyl ester	112-39-0
20	Oxacyclopentadecan-2-one, 15-methyl-	32539-85-8
21	1-Docosanol	661-19-8
22	Ethanol, 2-(9,12-octadecadienyloxy)-, (Z,Z)-	17367-08-7
23	Heptadecanoic acid, 10-methyl-, methyl ester	2490-25-7
24	1-Tricosanol	3133_01_5
25	2,5-Furandione, dihydro-3-octadecyl-	47458-32-2
26	17-(1,5-Dimethylhexyl)-10,13-dimethyl-4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro	No disponible
27	Ethyl iso-allocholate	No disponible
Hidrocarburos Alifáticos Nitrogenados		
28	Pyridine, 3-methyl-	108-99-6
29	Pyridine, 2,3-dimethyl-	583-61-9
30	Benzyl nitrile	140-29-4
31	Benzenamine, 3-methoxy-	536-90-3
32	Benzenepropanenitrile	645-59-0
33	1H-Pyrazole, 1,3,5-trimethyl-	1072-91-9
34	1H-Imidazole, 2,4,5-trimethyl-	822-90-2
35	Indole	120-72-9
36	1H-Indole, 4-methyl-	16096-32-5
37	1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-methyl-	550-44-7
38	Pyridine, 4-phenyl-	939-23-1
39	Benzonitrile, 2,4,6-trimethyl-	2571-52-0
40	Hydrazinecarboxylic acid, 2-benzoyl-, ethyl ester	10465-97-1
41	9H-Pyrido[3,4-b]indole, 1-methyl-	486-84-0

Anexos

...Continuación Anexo 1

Hidrocarburos Aromáticos		
42	Styrene	100-42-5
43	Benzene, 2-propenyl-	300-57-2
44	Benzene, ethoxy-	103-73-1
45	Benzene, octyl-	2189-60-8
46	Benzene, 1,1'-(1,3-propanediyl)bis-	1081-75-0
47	Benzene, decyl-	104-72-3
48	Methyl phenyl methylphosphanate	7526-25-2
49	Benzene, (1-butyloctyl)-	2719-63-3
50	Benzene, undecyl-	6742-54-7
51	Benzene, [3-(2-cyclohexylethyl)-6-cyclopentylhexyl]-	55334-30-0
52	Benzene, (1-pentyloctyl)-	4534-49-0
53	Benzene, (1-methyldodecyl)-	4534-53-6
54	Benzene, (3-octylundecyl)-	5637-96-7
Hidrocarburos Alifáticos		
55	1-Decene	872-05-9
56	1-Dodecene	112-41-4
57	Cyclotridecane	295-02-3
58	Tridecane	629-50-5
59	Tridecane, 2-methyl-	1560-96-9
60	1-Tetradecene	1120-36-1
61	Tetradecane	629-59-4
62	1-Pentadecene	13360-61-7
63	1-Hexadecene	629-73-2
64	Hexadecane	544-76-3
65	8-Heptadecene	2579_04_6
66	1-Heptadecene	6765-39-5
67	Heptadecane	629-78-7
68	9-Nonadecene	31035-07-1
669	10-Heneicosene (c,t)	95008-11-0
70	Bicyclo[4.2.0]oct-1-ene, exo-7-(1-cyclohexen-1-yl)-	No disponible
71	Cyclohexane, [6-cyclopentyl-3-(3-cyclopentylpropyl)hexyl]-	55401-72-4
72	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-	55282-12-7
73	Eicosane, 7-hexyl-	55333-99-8
74	Docosane	629-97-0
75	Docosane, 11-butyl-	13475-76-8
76	Tricosane, 2-methyl-	1928-30-9
Alifáticos Nitrogenados		
77	Tricyclo[4.3.1.1(3,8)]undecan-1-amine	31083-61-1
78	Spiro[2.5]octane-1,1-dicarbonitril	68352-24-9
79	Heptadecanenitrile	5399-02-0
80	Octadecanenitrile	638-65-3
81	Nonadecanenitrile	28623-46-3
82	5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine	190755
83	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	5654-86-4
84	Oleanitrile	
85	Eicosanenitrile	4616-73-3
86	Octadecanamide	124-26-5

87	Nonadecanamide	58185-32-3
88	cis-11-Eicosenamide	10436-08-5
89	13-Docosenamide, (Z)-	112-84-5
Alifáticos Aromáticos Oxigenados		
90	Phenol, 4-methyl-	106-44-5
91	Phenol, 2-ethyl-	90-00-6
92	Ethanone, 1-(2-benzofuranyl)-	1646-26-0
93	Phenol, 4-(2-aminopropoxy)-3,5-dimethyl-	53566-99-7
94	(2-Methylphenyl)phenylcarbinol, acetate (ester)	
95	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	27554-26-3
Aromáticos Sulfurados		
96	3-(N,N-Dimethylaurylammonio)propanesulfonate	14933-08-5
97	Pyridine-3-carboxylic acid, 2-methylthio-, (1-amino-2-chloroethenylidenamino) ester	252914-63-9
98	Thiocyanic acid 4-methoxy-2,6-dimethyl-3-pyridyl ester	No disponible
99	3-(Benzylthio)acrylic acid, methyl ester	77611-66-6
100	Acetamide, 2-(6-methyl-2-methylsulfanylpurimidin-4-yloxy)-N-phenyl-	1000316-17-7
Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos		
101	Fluoranthene	206-44-0
102	2,4-Dibenzyl-5,8-dimethoxy-6-methyl-1-naphthol	86649-80-1
Esteroides		
103	Cholest-3-ene, (5à)-	28338-69-4
104	Cholest-7-ene, (5.alpha.)-	40071-65-6
105	Cholesta-2,4-diene	4117-50-4
106	Cholest-4-ene	16732-86-8
107	Cholest-2-ene	15910-23-3
108	Cholestane	481-21-0
109	Cholest-3-ene, (5.beta.)-	13901-20-7
110	Cholesta-3,5-diene	747-90-0
111	3.alpha.,5-Cyclo-5.alpha.-cholestan-2-one	26753-93-5
112	Stigmasta-4,22-diene	76866-92-7
113	Cholest-4-en-3-one	601-57-0
114	Stigmasterol	83-48-7
115	9,19-Cycloergost-24(28)-en-3-ol, 4,14-dimethyl-, (3.beta.,4.alpha.,5.alpha.)-	469-39-6
116	Ergosta-5,24(28)-dien-3-ol, (3á)-	474-63-5
117	Cholesta-4,7-dien-3-ol, 4-methyl-, (3.alpha.)-	1000115-57-4
118	4.alpha.,5-Cyclo-A-homo-5.alpha.-cholestan-6-one	1000100-12-7
119	Stigmast-5-en-3-ol, oleate	3712-16-1

Anexos

Anexo 2. Caracterización química del líquido de pirólisis Madrid obtenido a 530°C

Nº	Grupo Químico	Número CAS
Hidrocarburos Alifáticos Oxigenados		
1	Hexanal, 3,5,5-trimethyl-	5435-64-3
2	5-Dodecanol acetate	60826-24-6
3	Tricyclo[4.3.1.1(3,8)]undecan-3-ol	No disponible
4	Bicyclopentyl-1'-en-1-ol	No disponible
5	Borane, diethyl(decyloxy)-	No disponible
6	Bicyclo[3.3.1]nonane-2,7-dione	199723-73-4
7	E-2-Hexadecacen-1-ol	No disponible
8	2,4,6,(1H,3H,5H)-Pyrimidinetriene,	67-52-7
9	6,10,14-Trimethyl-pentadecan-2-ol	No disponible
10	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, m	5129-60-2
11	Sulfurous acid, butyl cyclohexylmet	No disponible
12	1-Hexadecanol, 3,7,11,15-tetramet	No disponible
13	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl hexyl e	No disponible
14	16-Octadecenoic acid, methyl ester	56554-49-5
15	Octadecanoic acid, methyl ester	112-61-8
16	Ursodeoxycholic acid	128-3-2
17	Pregnan-20-one, 3-(acetyloxy)-5,6-	14148-09-5
18	Docosanoic acid, 1,2,3-propanetriyl	18641-57-1
19	2,5-Furandione, 3-dodecyl-	No disponible
20	4,4-Dimethylandrosta-3,17-dion-19-	No disponible
21	7-Dehydrodiosgenin	No disponible
Hidrocarburos Alifáticos Nitrogenados		
22	Pyrazine, methyl-	109-08-0
23	1H-Pyrrole, 2-methyl-	636-41-9
24	Pyridine, 3-methyl-	108-99-6
25	Pyridine, 2-ethyl-	100-71-0
26	Pyridine, 2,3-dimethyl	583-61-9
27	Pyridine, 2,5-dimethyl-	589-93-5
28	Azetidine, 3-methyl-3-phenyl-	5961-33-1
29	p-Aminotoluene	106-49-0
30	Benzonitrile, 4-(dimethylamino)-	1197-19-9
31	2-n-Dodecylamino-1,4-naphthoquin	No disponible
32	1,2-Dihydro-5-acenaphthylenamine	4657-93-6
33	Norpheniramine acetate	117540-10-0
34	Benzamide, N-(3-amino-3-hydroxy)	No disponible
35	4-Methoxy-5-phenylmethoxy-pyrimid	No disponible
36	1H-Benzo[d]pyrrolo[1,2-a]imidazole	No disponible
37	1,2,4,5-Tetrazine	290-96-0
38	Pyrrolidine, 1-[1-oxo-5-(3-undecyloxi)	No

Hidrocarburos Aromáticos		
39	Benzene, 1-propenyl-	637-50-3
40	Benzene, propyl-	103-65-1
41	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-	620-14-4
42	à-Methylstyrene	98-83-9
43	Benzene, 1-ethynyl-4-methyl-	766-97-2
44	Benzene, (2-methylpropyl)-	538-93-2
45	Benzene, 1-methyl-2-propyl-	1074-17-5
46	Benzene, 1-methyl-4-(1-propynyl)-	2749-93-1
47	Benzene, pentyl-	538-68-1
48	Benzenepropanenitrile	645-59-0
49	Benzene, heptyl-	1078-71-3
50	Biphenyl	92-52-4
51	Benzene, octyl-	2189-60-8
52	2,4-Dimethoxytoluene	38064-90-3
53	Benzene, 1,1'-(1,3-propanediyl)bis-	1081-75-0
54	Benzene, decyl-	104-72-3
55	Benzene, (1-methyldecyl)-	4536-88-3
56	Benzene, (1-butyloctyl)-	2719-63-3
57	Benzene, undecyl-	6742-54-7
58	Benzene, (3-octylundecyl)-	5637-96-7
59	Benzene, (1,3,3-trimethylnonyl)-	54986-44-6
60	2,4,6-Trimethoxystyrene	No disponible
61	Benzene, [3-(2-cyclohexylethyl)-6-c	No disponible
62	7-Phenylbicyclo[3.2.1]octa-2,6-die	No disponible
63	p-Terphenyl	92-94-4
64	n-Heptadecylbenzene	14752-75-1
65	Benzene, ethenylpentaethyl-	No disponible
66	Benzene, nonadecyl-	29136-19-4
67	1,1-Diphenyl-1-methoxyethane	No disponible
Hidrocarburos Alifáticos		
68	1-Butene, 3,3-dimethyl-	558-37-2
669	1-Butene, 2,3,3-trimethyl-	594-56-9
70	2-Cyclopenten-1-one	930-30-3
71	1,6-Octadiene, 3,5-dimethyl-, trans-	No disponible
72	2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	1120-73-6
73	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-	2758-18-1
74	1-Decene	872-05-9
75	Decane	124-18-5
76	Cyclododecane	294-62-2
77	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	No disponible
78	1-Tridecene	2437-56-1
79	Tridecane	629-50-5
80	10-Methylnonadecane	56862-62-5
81	1-Tetradecene	1120-36-1

Anexos

...Continuación Anexo 2

82	7-Tetradecene E	41446-63-3
83	Undecane, 2,8-dimethyl-	17301-25-6
84	Pentadecane	629-62-9
85	Pentadecane-4-Methyl	2801-87-8
86	1-Hexadecene	629-73-2
87	Hexadecane	544-76-3
88	Cyclobutane, tetrakis(1-methylethyl)	No disponible
89	8-Heptadecene	54290-12-9
90	1-Octadecene	112-88-9
91	Heptadecane	629-78-7
92	1,13-Tetradecadiene	21964-49-8
93	Cyclododecane, ethyl-	No disponible
94	3-Octadecene	7206-19-1
95	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)	55282-12-7
96	Nonadecane	629-92-5
97	Cyclopentadecane	295-48-7
98	Heneicosane	629-94-7
99	9-Tricosene, (Z)-	27519-02-4
100	17-Pentatriacontene	6971-40-0
101	Stannane, triethylmethyl	2097-60-1
Alifáticos Nitrogenados		
102	Pentanenitrile, 4-methyl-	542-54-1
103	3-Amino-2-cyclohexenone	No disponible
104	Cyanamide, dimethyl	1467-79-4
105	Benzyl nitrile	140-29-4
106	3-Dimethylaminoacrylonitrile	2407-68-3
107	Pentadecanenitrile	18300-91-9
108	Hexadecanenitrile	629-79-8
109	Heptadecanenitrile	5399-02-0
110	Tetradecanamide	638-58-4
111	Oleanitrile	No disponible
112	9-Octadecenamide, (Z)-	301-02-0
113	Octadecanamide	124-26-5
114	Eicosanenitrile	4616-73-3
Aromáticos Sulfurados		
115	4-(Methylthio)benzonitrile	21382-98-9
116	Benzo[b]thiophene, octahydro-2-m	No disponible
117	Thiophen-2-methylamine, N,N-dioct	No disponible
118	1,4-Dithiin, 2,3-dihydro-5-phenyl-	35756-26-4
119	Thiophene, 2-dodecyl-	4861-61-4
Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos		
120	Indane	496-11-7
121	1H-Indene, 2,3-dihydro-4-methyl-	824-22-6
122	Naphthalene, 1,2-dihydro-	447-53-0

123	1H-Indene, 1-methylene-	2471-84-3
124	2-Ethyl-1-H-indene	17059-50-6
125	Indole	120-72-9
126	Naphthalene, 2-methyl-	91-57-6
127	Dibenzylmercury	780-24-5
128	1H-Indole, 5-methyl-	614-96-0
129	Naphthalene, 2-ethenyl-	827-54-3
130	Naphthalene, 2,7-dimethyl-	582-16-1
131	1H-Indole, 5,6,7-trimethyl-	
132	Anthracene, 1,4-dimethyl-	781-92-0
133	Phenanthrene, 1-methyl-7-(1-methyl)	483-65-8
134	1H-Cyclopenta[l]phenanthrene, 2,3	No disponible
135	Pyrene, 1,3-dimethyl-	64401-21-4
136	1,2,3,10,11,12-Hexahydروperylene	No disponible
137	Phenanthrene, 2-dodecyl-9,10-dihy	No disponible
138	1,2-Diaza-10,19-dithia[2,3,3]metacy	No disponible
Esteroides		
139	Cholest-24-ene, (5á)-	No disponible
140	Cholest-3-ene, (5á)-	No disponible
141	Coprostone	481-20-9
142	Cholest-2-ene, (5à)-	No disponible
143	Cholesta-2,4-diene	4117-50-4
144	Cholest-4-ene	16732-86-8
145	Cholestane	481-21-0
146	Cholesta-3,5-diene	747-90-0
147	19-Norcholesta-1,3,5(10)-trien-6-on	73483-44-0
148	a-Homocholest-4a-en-3-one	No disponible
149	Stigmastane	601-58-1
150	Ergosta-5,24(28)-dien-3-ol, (3á)-	No disponible
151	Cholestan-3-ol, (3à,5á)-	No disponible
152	Ergosta-4,6,22-trien-3.beta.-ol	No disponible
153	Cholest-24-ene, (5.beta.)-	No disponible
154	Cholestane-2,3-diol, 3-acetate	No disponible
155	5Alpha-cholestane-3alpha,5,6beta-	1253-84-5
156	Cholest-5-ene, 3á-chloro-	No disponible
157	Cholest-5-en-3-one	601-54-7
Halogenuros		
158	2-Propynenitrile, 3-fluoro-	32038-83-8
159	Cyclopropene, 1-bromo-2,3,3-trifluor	No disponible
160	4-(2-Chloroethyl)-styrene	No disponible
161	Dichloroacetic acid, heptadecyl es	No disponible
162	1-Phenoxy-2-chloropropane	53491-30-8
163	Cyclohexane, iodo-	626-62-0
164	Benzaldehyde, 5-benzyloxy-2-fluoro	No disponible
165	2- Chloropropionic acid, hexadecyl	No disponible
166	2- Chloropropionic acid, octadecyl	No disponible
167	3-Bromo-5-ethoxy-4-hydroxybenzald	No disponible

Anexos

Anexo 3. Caracterización química del líquido de pirólisis Madrid obtenido a 650°C

Nº	Grupo Químico	Número CAS
Hidrocarburos Alifáticos Oxigenados		
1	Octadecanoic acid, methyl ester	112-61-8
Hidrocarburos Alifáticos		
2	1-Butene, 3,3-dimethyl-	558-37-2
3	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	36262-09-6
4	2-Dodecene, (E)-	7206-13-5
5	1-Dodecene	112-41-4*
6	1-Tridecene	2437-56-1*
7	Pentadecane	629-62-9*
8	1-Heptadecene	6765-39-5
9	5-Octadecene, (E)-	7206-21-5
10	Heptadecane	629-78-7
11	1-Eicosene	3452_07-1
Hidrocarburos Alifáticos Nitrogenados		
12	Methallyl cyanide	4786-19-0
13	Hexadecanenitrile	629-79-8
14	Eicosanenitrile	
Hidrocarburos Aromáticos Nitrogenados		
15	Pyridine, 3-methyl-	108-99-6
16	Pyridine, 2-methyl-	109-06-8*
17	4-Pyridinamine	504-24-5
18	1H-Pyrrole, 1-methyl-	96-54-8
19	1H-Pyrrole, 3-methyl-	616-43-3
20	1,3-Diazine	289-95-2
21	2-Pyridinecarboxylic acid, 6-methyl-	934-60-1
22	Benzonitrile, 4-(hydroxymethyl)-	874-89-5
23	Benzonitrile, 2-methyl-	529-19-1
24	Benzyl nitrile	140-29-4
25	p-Ethylbenzonitrile	25309-65-3
26	Benzenepropanenitrile	645-59-0
27	Indole	120-72-9*
28	Pyridine, 2-phenyl-	1008-89-5

29	Pyridine, 4-phenyl-	939-23-1
30	1H-Pyrrole, 2-phenyl-	3042-22-6
31	[1,1'-Biphenyl]-2-amine	90-41-5
32	6H-Dibenz[b,f]oxireno[d]azepine-6-carboxamide, 1a,10b-dihydro-	36507-30-9
33	7-Nitro-1,3-dihydroindol-2-one	1000302-95-4
34	Carbazole	86-74-8
35	Carnegine	490-53-9
Hidrocarburos Aromáticos		
36	p-Xylene	106-42-3
37	Styrene	100-42-5
38	Benzene, 2-propenyl-	300-57-2
39	Indene	95-13-6*
40	1H-Indene, 1-methyl-	767-59-9
41	1H-Indene, 1-methylene-	2471-84-3
42	Cycloprop[a]indene, 1,1a,6,6a-tetrahydro-	15677-15-3
43	1H-Indene, 1,1-dimethyl-	18636-55-0
44	Benzocycloheptatriene	264-09-5
45	Biphenyl	92-52-4
46	1H-Indole, 5-methyl-	614-96-0
47	Biphenylene	259-79-0
48	Benzene, octyl-	2189-60-8
49	1,1'-Biphenyl, 4-methyl-	644-08-6
50	Benzene, [1-(2,4-cyclopentadien-1-ylidene)ethyl]-	2320-32-3
51	Diphenylmethane	101-81-5*
52	Fluorene	86-73-7
53	3,3'-Dimethylbiphenyl	612-75-9
54	9H-Fluorene, 9-methyl-	2523-37-7
55	Bi-1,3,5-cycloheptatrien-1-yl	35393-05-6
56	9H-Fluorene, 2-methyl-	1430-97-3
57	9H-Fluorene, 4-methyl-	1556-99-6
58	9H-Fluorene, 1-methyl-	1730-37-6
59	9H-Fluorene, 9-methylene-	4425-82-5
60	1,2-Diphenylethylene	588-59-0
61	Ethylene, 1,1-diphenyl-	530-48-3
62	Diphenylethyne	501-65-5
63	9H-Fluorene, 2,3-dimethyl-	4612-63-9
64	1H-Cyclopropa[l]phenanthrene,1a,9b-dihydro-	949-41-7
65	1,4-Diphenyl-1,3-butadiene	886-65-7
66	di-p-Tolylacetylene	2789-88-0
67	o-Terphenyl	84-15-1*

Anexos

...Continuación Anexo 3

Hidrocarburos Aromáticos Oxigenados		
68	Bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene	694-87-1
669	Phenol	108-95-2
70	Phenol, 2-methyl-	95-48-7
71	Phenol, 4-methyl-	106-44-5
72	Phenol, 3-methyl-	108-39-4
73	DL-Tyrosine	556-03-6
74	Phenol, 4-ethyl-	123-07-9
75	Benzaldehyde, 4,6-dihydroxy-2,3-dimethyl	2990-31-0
76	Benzaldehyde, 2,4-dimethoxy-	613-45-6
77	5á-Podocarpa-8,11,13-trien-16-oic acid, methyl ester	3745-36-6
Aromáticos Sulfurados		
No fueron encontrados		
Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos		
78	Naphthalene, 1,2-dihydro-	447-53-0
79	Naphthalene	91-20-3
80	Azulene	275-51-4
81	Isoquinoline	119-65-3
82	Naphthalene, 1,2-dihydro-3-methyl-	2717-44-4
83	Naphthalene, 1-methyl-	90-12-0
84	Naphthalene, 2-methyl-	91-57-6
85	Isoquinoline, 1-methyl-	1721-93-3
86	Quinoline, 7-methyl-	612-60-2
87	1-Naphthalenecarboxylic acid, 5,6,7,8-tetrahydro-	4242-18-6
88	Naphthalene, 2-ethenyl-	827-54-3
89	Naphthalene, 1,3-dimethyl-	575-41-7
90	Acenaphthene	83-32-9
91	Naphthalene, 1,6-dimethyl-	575-43-9
92	Naphthalene, 1,7-dimethyl-	575-37-1
93	Naphthalene, 1,4-bis(bromomethyl)-	58791-49-4
94	Naphthalene, 1,4-dimethyl-	571-58-4
95	Naphthalene, 2,6-dimethyl-	581-42-0
96	Naphthalene, 1-ethyl-	1127-76-0
97	Naphthalene, 2-(1-methylethenyl)-	3710-23-4
98	Naphthalene, 1-isocyano-	1984_04_9
99	Naphthalene, 2,3,6-trimethyl-	829-26-5
100	Naphthalene, 1,4,6-trimethyl-	2131-42-2
101	Isoquinoline, 1-propyl-	7661-37-2
102	1H-Phenalene	203-80-5

103	Naphthalene, 1,6,7-trimethyl-	2245-38-7
104	Naphthalene, 1-(2-propenyl)-	2489-86-3
105	Naphthalene, 2-(2-nitro-2-propenyl)	80255-28-3
106	3H-Benz[e]indene, 2-methyl	150096-60-9
107	Phenanthrene, 9,10-dihydro-	776-35-2
108	Phenanthrene, 4-methyl-	832-64-4
109	Anthracene	120-12-7
110	Phenanthrene, 9,10-dihydro-1-methyl-	95676-48-5
111	4-Phenanthrenol, 1,2,3,4-tetrahydro-4-methyl-	77536-58-4
112	1,4-Ethenoanthracene, 1,4-dihydro-	27765-96-4
113	Anthracene, 9-methyl-	779-02-2
114	Anthracene, 2-methyl-	613-12-7
115	Anthracene, 1-methyl-	610-48-0
116	Phenanthrene, 2-methyl-	2531-84-2
117	Phenanthrene, 1-methyl-	832-69-9
118	2-Phenylnaphthalene	35465-71-5
119	Phenanthrene, 3,6-dimethyl-	1576-67-6
120	Fluoranthene	206-44-0
121	Anthracene, 2-ethyl-	52251-71-5
122	Pyrene	129-00-0
123	Phenanthrene, 2,3,5-trimethyl	3674-73-5
124	Pyrene, 1-methyl-	2381-21-7
125	Pyrene, 2-methyl-	3442-78-2*
126	11H-Benzo[b]fluorene	243-17-4
127	Fluoranthene, 2-methyl-	33543-31-6
128	Pyrene, 1,3-dimethyl-	64401-21-4
129	Pyrene, 1,9-dimethyl-	74298-70-7
130	Triphenylene	217-59-4
131	Chrysene, 6-methyl-	1705-85-7
Esteroides		
132	Cholest-3-ene, (5á)-	13901-20-7
133	3Beta-tosyloxy-5alpha-cholestane	3381-52-0

Anexos

Anexo 4. Caracterización química del líquido de pirólisis Valladolid obtenido a 450°C

Nº	Grupo Químico	Número CAS
Hidrocarburos alifáticos oxigenados		
1	2-Cyclopenten-1-one	930-30-3
2	Pentanenitrile, 4-methyl-	542-54-1
3	2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	1120-73-6
4	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl	2758-18-1
5	10-Undecenal	112-45-8
6	1-Tridecanol	112-70-9
7	11-Tetradecyn-1-ol	339925-72-3
8	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4.beta.,5.alpha.)-	No disponible
9	Methyl 7,9-tridecadienyl ether	No disponible
10	1-Hexadecanol	36653-82-4
11	Z,E-3,13-Octadecadien-1-ol	No disponible
12	E-8-Methyl-9-tetradecen-1-ol acetate	No disponible
13	Longifolenaldehyde	19890-84-7
14	Eicosanenitrile	4616-73-3
Aromáticos Nitrogenados		
15	Pyridine, 2-methyl-	109-06-8
16	Pyrazine, methyl-	109-08-0
17	1H-Pyrrole, 3-methyl-	616-43-3
18	1H-Pyrrole, 2-methyl-	636-41-9
19	Pyridine, 3-methyl-	108-99-6
20	Pyridine, 2-ethyl-	100-71-0
21	1,3-Benzenediamine	108-45-2
22	Pyridine, 3,5-dimethyl-	591-22-0
23	Pyridine, 2,4-dimethyl-	108-47-4
24	Pyrrole, 4-ethyl-2-methyl-	5690-96-0
25	2-Aminopyridine	504-29-0
26	Aniline, N-methyl-	100-61-8
27	4-Pyridinamine	504-24-5
28	Benzyl nitrile	140-29-4
29	Benzonitrile, 2-methyl-	529-19-1
30	2-Pyridinamine, 5-methyl-	1603-41-4
31	Imidazole, 1,4,5-trimethyl-	
32	Benzenepropanenitrile	645-59-0
33	Indolizine	274-40-8
34	Indole	120-72-9
35	1H-Indole, 4-methyl-	16096-32-5
36	1H-Indole, 5-methyl-	614-96-0
37	2,3-Quinoxalinedione, 1,4-dihydro-6-methyl-	92473-54-6
38	Pyridine, 4-phenyl-	939-23-1

39	1H-Indole, 2,3-dimethyl-	91-55-4
40	Benzenamine, 3-methoxy-	536-90-3
41	1H-Indazole, 3,6-dimethyl-	7746-28-3
42	Alstophyllan-19-one, 4-oxide	No disponible
Hidrocarburos aromáticos		
43	Styrene	100-42-5
44	.alpha.-Methylstyrene	98-83-9
45	1H-Indene, 1-methyl-	767-59-9
46	Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	767-59-9
47	Phosphine, phenyl-	638-21-1
48	Benzene, heptyl-	1078-71-3
49	3,3'-Dimethylbiphenyl	612-75-9
50	Benzene, nonyl-	1081-77-2
51	Benzene, (1-pentylheptyl)-	2719-62-2
52	Benzene, 1,1'-(1,3-propanediyl)bis	1081-75-0
53	Benzene, (1-methyldecyl)-	4536-88-3
54	Benzene, (1-butylheptyl)-	4537-15-9
55	Benzene, (1,3,3-trimethylnonyl)-	No disponible
56	Benzene, (1-pentylloctyl)-	4534-49-0
57	Benzene, (1-butylnonyl)-	4534-50-3
Hidrocarburos Alifáticos		
58	Cyclopentanone	120-92-3
59	Cyclohexane, pentyl-	4292-92-6
60	1,3-Dimethyl-1-cyclohexene	2808-76-6
61	1-Tridecene	2437-56-1
62	2,3-Dimethyldodecane	6117-98-2
63	Cyclooctane, 1,5-dimethyl-	21328-57-4
64	Cyclododecane	294-62-2
65	Hexane, 2-phenyl-3-propyl-	No dispo
66	Hexadecane	544-76-3
67	8-Heptadecene	54290-12-9
68	Heptadecane	629-78-7
69	Z-5-Nonadecene	No disponible
70	1-Nonadecene	18435-45-5
71	Octadecane	593-45-3
72	10-Methyl-9-nonadecene	No disponible
73	1,13-Tetradecadiene	21964-49-8
74	Nonadecane	629-92-5
75	Cyclopentadecane	295-48-7
76	Cyclohexadecane	295-65-8
77	Heneicosane	629-94-7
78	Heptadecane, 9-hexyl	55124-79-3
79	Cholest-2-en-1-ol	No disponible

Anexos

...Continuación Anexo 4

Alifáticos Nitrogenados		
80	4-Cyanocyclohexene	100-45-8
81	Dodecanenitrile	2437-25-4
82	Tridecanenitrile	629-60-7
83	2-Bornanone oxime	13559-66-5
84	Hexadecanenitrile	629-79-8
85	Heptadecanenitrile	5399-02-0
86	Octadecanenitrile	638-65-3
87	Nonadecanenitrile	28623-46-3
Hidrocarburos Aromáticos Oxigenados		
88	Phenol	108-95-2
89	Phenol, 4-methyl-	106-44-5
90	Phenol, 2-methyl-	95-48-7
91	Phenol, 3-ethyl-	620-17-7
92	o-Dodecylphenol	No disponible
Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos		
93	Naphthalene	91-20-3
94	Isoquinoline, 3-methyl-	1125-80-0
95	Pyrene	129-00-0
96	Pyrene, 1,3-dimethyl-	64401-21-4
97	Phenanthrene, 2-dodecyl-9,10-dihydro-	No disponible
Esteroides		
98	Cholest-4-ene	16732-86-8
99	Cholest-5-ene	570-74-1
100	Cholesta-2,4-diene	4117-50-4
101	Cholest-3-ene, (5á)-	28338-69-4
102	Cholest-2-ene, (5.alpha.)-	570-73-0
103	Cholest-7-ene, (5.alpha.)-	No disponible
104	Cholesta-3,5-diene	747-90-0
105	19-Norcholesta-1,3,5(10)-trien-6-one	73483-44-0
106	4à-Methylcholest-7-en-3-one	No disponible
107	Chol-8(14)-en-24-ol, (5.beta.)-	No disponible
108	4,4-Dimethylandrosta-3,17-dion-19-oic acid	No disponible
109	Cholesta-4,7-dien3ol, 4methyl-(3alfa)-	No disponible
110	Anthraegostatrine	No disponible
111	Cholestan-3-ol, (3.beta.,5.beta.)-	360-68-9
112	Stigmastan-3,5-diene	No disponible
Halogenados		
113	Benzene, 1,2,4-trichloro-3-methyl-	2077-46-5
114	2- Chloropropionic acid, pentadecylester	No disponible

Anexo 5. Caracterización química del líquido de pirólisis Valladolid obtenido a 530°C

Nº	Grupo Químico	Número CAS
Hidrocarburos Alifáticos oxigenados		
1	2-Hexanone, 6-hydroxy-	21856-89-3
2	Bicyclo[2.1.1]hexan-2-ol, 2-ethenyl-	No disponible
3	2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-	1120-73-6
4	Ethanone, 1-(2-furanyl)-	1192-62-7
5	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-	2758-18-1
6	8-Nonene-2,4-diol, 8-methyl-, (R*,S*)-	63013-22-9
7	1-Heptadecanol	1454-85-9
8	9-Heptadecanone	540-08-9
9	1-Hexadecanol, acetate	629-70-9
10	Carbonic acid, octadecyl propyl ester	No disponible
11	Oleic Acid	112-80-1
12	9,12-Hexadecadienoic acid, methyl ester	2462-80-8
13	Palmitic acid, 9-hexadecenyl ester, (Z)-	22393-90-4
14	1-Tricosanol	3133_01-5
Hidrocarburos Aromáticos Nitrogenados		
15	Pyridine, 4-methyl-	108-89-4
16	Pyridine, 2-methyl-	109-06-8
17	Pyridine, 3-methyl-	108-99-6
18	Pyridine, 2-ethyl-	100-71-0
19	Pyridine, 3,5-dimethyl-	591-22-0
20	Benzonitrile	100-47-0
21	2-Pyridinecarbonitrile	100-70-9
22	Benzyl nitrile	140-29-4
23	Benzonitrile, 4-(dimethylamino)-	1197-19-9
24	Benzenepropanenitrile	645-59-0
25	Indolizine	274-40-8
26	1H-Indole, 3-methyl-	83-34-1
27	Benzonitrile, 2,4,6-trimethyl-	2571-52-0
28	1H-Indole, 2,3-dimethyl-	91-55-4
29	1H-Pyrazole-1-carboxaldehyde, 4-ethyl-4,5-dihydro-5-propyl-	54411-09-5
30	2,4-Pyrimidinedione, 1,2,3,4-tetrahydro-6-amino-5-formylmethylamino-1-methyl-	33130-54-0
31	2-Phenylcarbamoypyrrolidine-1-carboxylic acid, benzyl ester	No disponible
32	3-Benzoyl-2-t-butyl-4-methyl-1,3oxazolidin-5-one	No disponible
33	Isoxazolo[3,4-a]benzo[d]cyclohepten-3-one, 1,4,9,10-tetrahydro-4-phenyl-	No disponible
34	Imidazole, 2-bromo-4-methyl-5-nitro-	105983-46-8
35	Pyrene, 1,3-dimethyl-	64401-21-4
36	Pyrene, 1,9-dimethyl-	074298-70-7

Anexos

...Continuación Anexo 5

37	Pagicerine	99831-97-7
38	1-Cyano-1,2,3,8a-tetrahydroindolizin-3-spiro-9'-fluorene	1000286-34-1
Hidrocarburos Aromáticos		
39	Styrene	100-42-5
40	Benzene, 1-ethynyl-4-methyl-	766-97-2
41	1H-Indene, 3-methyl-	767-60-2
42	1H-Indene, 1-methyl-	767-59-9
43	1H-Indene, 4,7-dimethyl-	6974-97-6
44	Benzene, hexyl-	1077-16-3
45	Benzene, heptyl-	1078-71-3
46	1-Methyl-2-n-hexylbenzene	1595-10-4
47	(1-Methylpenta-1,3-dienyl)benzene	116669-49-9
48	Benzene, (2,4-cyclopentadien-1-ylidenemethyl)-	7338-50-3
49	Benzene, octyl-	2189-60-8
50	Benzene, (1-methylheptyl)-	777-22-0
51	1,1'-Biphenyl, 4-methyl-	000644-08-6
52	Benzene, nonyl-	1081-77-2
53	3,3'-Dimethylbiphenyl	612-75-9
54	Benzene, (1-butylheptyl)-	4537-15-9
55	Benzene, (1-propylheptadecyl)-	2400_03_5
56	Benzene, 1,1'-(1,3-propanediyl)bis-	1081-75-0
57	Benzene, (1-ethylnonyl)-	4536-87-2
58	Benzene, decyl-	104-72-3
59	Benzene, (1-methyldecyl)-	4536-88-3
60	1,2-Diphenylethylene	588-59-0
61	9H-Fluorene, 2-methyl-	1430-97-3
62	Benzene, (1-butyloctyl)-	2719-63-3
63	Benzene, undecyl-	6742-54-7
64	Diphenylethyne	501-65-5
65	Benzene, (1,3,3-trimethylnonyl)-	54986-44-6
66	Benzene, (1-pentyloctyl)	4534-49-0
67	Benzene, (1-butylnonyl)-	4534-50-3
68	Benzene, 1,1'-tetradecylidenebis-	55268-63-8
69	Benzene, dodecyl-	123-01-3
70	Benzene, (1-methyldodecyl)-	4534-53-6
71	p-Terphenyl	92-94-4
72	6-Methyl-8-phenylbenzocyclohepten-7-one	No disponible
73	4b,5,6,12-Tetrahydrochrysene	31570-60-2
74	o-Terphenyl	84-15-1
75	Benzene, ethenylpentaethyl-	2715-34-6
76	1,1'-Biphenyl, 4-acetyl-4'-(4-pentylcyclohexyl)-	68065-88-3
Hidrocarburos Alifáticos		
77	1-Undecene	821-95-4
78	Cyclododecane	294-62-2
79	Dodecane	112-40-3

80	1-Tridecene	2437-56-1
81	1-Tetradecene	1120-36-1
82	Nonadecane, 9-methyl-	13287-24-6
83	5-Octadecene, (E)-	7206-21-5
84	Nonadecane	629-92-5
85	1-Docosene	1599-67-3
86	Heneicosane, 11-(1-ethylpropyl)-	55282-11-6
87	Cyclotetracosane	297-03-0
88	Heptadecane, 9-hexyl-	55124-79-3
89	Heptadecane, 9-hexyl-	55124-79-3
Alifáticos Nitrogenados		
90	Borazine, 1-methyl-	21127-94-6
91	Pentanenitrile, 4-methyl-	542-54-1
92	Borazine, 1,3,5-trimethyl-	1004-35-9
93	L-Alanine, N-isobutoxycarbonyl-, pentyl ester	No disponible
94	Ethyl N-tert-butylformimidate	55236-60-7
95	Hexadecanenitrile	629-79-8
96	Heptadecanenitrile	5399-02-0
97	Octadecanenitrile	638-65-3
98	Nonadecanenitrile	28623-46-3
99	Eicosanenitrile	4616-73-3
100	Oleanitrile	No disponible
101	Nonadecanamide	58185-32-3
Hidrocarburos Aromáticos Oxigenados		
102	Phenol	108-95-2
103	1-Hexen-4-ol, 3-methyl-6-phenyl-	304459-85-6
104	Acetophenone	98-86-2
105	Phenol, 4-methyl	106-44-5
106	Phenol, 3-methyl-	108-39-4
107	Benzenemethanol, 4-methyl-	589-18-4
108	Phenol, 2-ethyl-	90-00-6
109	3-Dodecene, 1-(benzyloxy)-4-methyl	No disponible
110	p-Methoxybenzoic acid, 2-isopropoxyphenyl ester	No disponible
111	Phenanthro[3,2-b]furan-7,11-dione, 1,2,3,4-tetrahydro-4,4,8-trimethyl-	20958-15-0
Aromáticos Sulfurados		
112	5-Oxohexanethioic acid, S-t-butyl ester	No disponible
113	Alpha-phenyl-alpha-tropylacetaldehyde tosylhydrazone	22532-16-7
114	N-[4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl]-p-toluene-sulfonamide	34711-50-7
Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos		
115	Naphthalene	91-20-3

Anexos

...Continuación Anexo 5

116	Naphthalene, 1,2-dihydro-3-methyl-	2717-44-4
117	Naphthalene, 1,2-dihydro-4-methyl-	4373-13-1
118	Naphthalene, 1-methyl-	90-12-0
119	Naphthalene, 2-methyl-	91-57-6
120	Isoquinoline, 3-methyl-	1125-80-0
121	Naphthalene, 2-ethenyl-	827-54-3
122	Naphthalene, 1,7-dimethyl	575-37-1
123	Naphthalene, 2,7-dimethyl-	582-16-1
124	Naphthalene, 2,6-dimethyl-	581-42-0
125	Naphthalene, 1,5-dimethyl-	571-61-9
126	Azulene, 4,6,8-trimethyl-	941-81-1
127	1-Naphthalenamine	134-32-7
128	Anthracene, 2-methyl-	613-12-7
129	Phenanthrene, 4-methyl-	832-64-4
130	Phenanthrene, 2,3-dimethyl-	3674-65-5
131	Pyrene	129-00-0
132	Phenanthrene, 1-methyl-7-(1-methylethyl)-	483-65-8
133	Phenanthrene, 2,3,5-trimethyl-	3674-73-5
134	Anthracene, 9-(2-propenyl)-	23707-65-5
135	11H-Benzo[b]fluorene	243-17-4
136	Acetic acid, 8-acetoxy-2-acetyl-3,6-dimethylnaphthalen-1-yl ester	89586-46-9
137	Phenanthrene, 2-dodecyl-9,10-dihydro-	55401-77-9
Esteroides		
138	Cholest-3-ene, (5.beta.)-	13901-20-7
139	Androstan-6-one, 3-(acetyloxy)-, (3.beta.,5.alpha.)-	20835-29-4
140	Cholest-7-ene, (5.alpha.)-	40071-65-6
141	Cholest-4-ene	16732-86-8
142	Cholest-2-ene, (5.alpha.)-	570-73-0
143	Cholesta-3,5-diene	747-90-0
144	19-Norcholesta-1,3,5(10)-trien-6-one	19454-79-6
145	a-Homocholest-4a-en-3-one	51355-04-5
146	Cholesta-8,24-dien-3-ol, 4-methyl-, (3á,4à)-	7199-92-0
147	4,4-Dimethylandrosta-3,17-dion-19-oic acid	1000195-75-1
Halogenados		
148	Benzene, 1,2,4-trichloro-3-methyl-	2077-46-5
149	Acetic acid, chloro-, hexadecyl ester	52132-58-8
150	1-Chloroeicosane	42217-02-7
151	N-(4-Chlorobenzylidene)-3,4-dimethylaniline	196792-24-2
152	2-Fluorobenzoic acid, 3-phenylpropyl ester	1000278-98-4
153	6-Amino-3-tert-butyl-4-(2,4-dichloro-phenyl)-1,4-dihydro-pyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile	No disponible
154	1-Chloro-4-(pentachloroethyl)benzene	830-39-7
155	Pregnane-3,20-diol, bis(trifluoroacetate), (3á,5à)-	56614-55-2

Anexo 6. Caracterización química del líquido de pirólisis Madrid obtenido a 650°C

Nº	Grupo Químico	Número CAS
1	Hidrocarburos Alifáticos Oxigenados	2758-18-1
	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-	
	Hidrocarburos Aromáticos Nitrogenados	
2	Pyridine, 2-methyl-	109-06-8
3	4-Pyridinamine	504-24-5
4	1H-Pyrrole, 3-methyl-	616-43-3
5	1H-Pyrrole, 2-ethyl-	1551-06-0
6	Pyridine, 3-methyl-	108-99-6
7	Pyrimidine, 2,4-dimethyl-	14331-54-5
8	Pyridine, 3,5-dimethyl-	591-22-0
9	Pyridine, 2-ethenyl-	100-69-6
10	Benzonitrile	100-47-0
11	4-Pyridinamine	504-24-5
12	Indene	95-13-6
13	Benzonitrile, 2-methyl-	529-19-1
14	Benzonitrile, 4-methyl-	104-85-8
15	Pyrazolo(2,3-a)pyridine, 7-methyl-	No disponible
16	3-Aminopyridine	462-08-8
17	Benzyl nitrile	140-29-4
18	Indole	120-72-9
19	1H-Indole, 2-methyl-	95-20-5
20	Quinoline, 2-ethenyl-	772-03-2
21	Pyrazolo[5,1-c][1,2,4]...	No disponible
22	Pyrene, 1-methyl-	2381-21-7
23	Pyrene, 2-methyl-	3442-78-2
24	Pyrene, 1,3-dimethyl-	64401-21-4
25	Pyrene, 1,9-dimethyl-	
26	Hidrocarburos Aromáticos	100-42-5
	Styrene	
	.alpha.-Methylstyrene	
	Benzene, 1-ethenyl-3-methyl-	
	Benzene, 1-ethynyl-4-methyl-	
	Benzene, 2-butenyl-	
	Benzene, 2-ethenyl-1,3-dimethyl-	
	1H-Indene, 2,3-dihydro-2-methyl-	
	Benzene, (3-methylbutyl)-	
	Benzene, (1-methylene-2-propenyl)-	
	Benzene, heptyl-	
	Biphenyl	

Anexos

...Continuación Anexo 6

37	1,1'-Biphenyl, 4-methyl-	644-08-6
38	1,1'-Biphenyl, 3-methyl-	643-93-6
39	5-Methyl-1-phenylhexa-1,3,4-triene	103240-79-5
40	Benzene, nonyl-	1081-77-2
41	4,4'-Dimethylbiphenyl	613-33-2
42	Ethylene, 1,1-diphenyl-	530-48-3
43	Benzene, undecyl	6742-54-7
44	Dibenzo[a,e]cyclooctene	262-89-5
45	di-p-Tolylacetylene	2789-88-0
Hidrocarburos Alifáticos		
46	3-Heptyne	2586-89-2
47	1-Tetradecene	1120-36-1
48	Dodecane, 3-methyl-	17312-57-1
49	Bi-2,4,6-cycloheptatrien-1-yl	831-18-5
50	1-Heptadecene	6765-39-5
51	Heptadecane	629-78-7
Hidrocarburos Alifáticos Nitrogenados		
52	Tetradecanenitrile	629-63-0
Hidrocarburos Aromáticos Oxigenados		
53	Phenol	108-95-2
54	Benzenepropanal	104-53-0
55	Phenol, 4-methyl-	106-44-5
56	Phenol, 3-ethyl-	620-17-7
Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos		
57	1,4-Dihydronaphthalene	612-17-9
58	Naphthalene, 1,2-dihydro-	447-53-0
59	Naphthalene	91-20-3
60	Quinoline	91-22-5
61	Naphthalene, 1,2-dihydro-3-methyl-	No disponible
62	Naphthalene, 1,2-dihydro-6-methyl-	2717-47-7
63	1,4-Methanonaphthalene, 1,4-dihydro-	4453-90-1
64	Naphthalene, 1-methyl-	90-12-0
65	Naphthalene, 2-methyl-	91-57-6
66	Isoquinoline, 3-methyl-	1125-80-0
67	Naphthalene, 1,4,5,8-tetrahydro-	493-04-9
68	Naphthalene, 1,3-dimethyl-	575-41-7
69	Naphthalene, 2-ethenyl-	827-54-3
70	Naphthalene, 1,6-dimethyl-	575-43-9
71	Naphthalene, 2,6-dimethyl-	581-42-0
72	Acenaphthene	83-32-9
73	Naphthalene, 1,8-dimethyl-	569-41-5
74	Naphthalene, 2,7-dimethyl-	582-16-1

75	Biphenylene	259-79-0
76	Naphthalene, 2,3-dimethyl-	581-40-8
77	Naphthalene, 2,3,6-trimethyl-	829-26-5
78	Azulene, 4,6,8-trimethyl-	941-81-1
79	1-Isopropenylnaphthalene	1855-47-6
80	Naphthalene, 2-(1-methylethenyl)-	3710-23-4
81	Fluorene-9-methanol	24324-17-2
82	Fluorene	86-73-7
83	9H-Fluorene, 2-methyl-	1430-97-3
84	1,4-Methanonaphthalene, 1,4-dihydro-9-((1-methylethylidene)-	7350-72-3
85	Anthracene, 2-methyl-	613-12-7
86	Phenanthrene	85-01-8
87	Anthracene	120-12-7
88	Phenanthrene, 9,10-dihydro-1-methyl-	95676-48-5
89	Anthracene, 9,10-dihydro-	613-31-0
90	Phenanthrene, 2-methyl-	2531-84-2
91	Phenanthrene, 3-methyl-	832-71-3
92	Anthracene, 9-methyl-	779-02-2
93	Phenanthrene, 1-methyl-	832-69-9
94	2-Phenylnaphthalene	35465-71-5
95	Anthracene, 1,4-dimethyl-	781-92-0
96	Phenanthrene, 2,5-dimethyl-	3674-66-6
97	Phenanthrene, 3,6-dimethyl-	1576-67-6
98	Naphthalene, 1,2-dihydro-4-phenyl-	7469-40-1
99	Fluoranthene	206-44-0
100	Phenanthrene, 4,5-dimethyl-	3674-69-9
101	p-Terphenyl	92-94-4
102	11H-Benzo[b]fluorene	30777-19-6
103	5,6-Dihydrochrysene	
104	Chrysene	218-01-9
Halogenados		
105	2-Amino-5-chloropyrimidine	5428-89-7
106	Benzene, 1,2,4-trichloro-3-methyl-	2077-46-5
107	Benzenamine, 4-chloro-N,N-dimethyl	698-69-1
108	7-Heptadecene, 17-chloro-	No disponible
109	1,2-Dimethoxy-3,4-dichloro-benzene	90283-00-4

Anexos

Anexo 7. Índice de germinación (IG), longitud media de la radícula (LR) e hipocótilo (LH) para las muestras de lixiviados (25 y 50% v/v), usando semillas de *Lepidium sativum* como indicador.

		25%							
		Control	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
2008	IG (%)	100	99,00	89,23	89,03	86,31	96,04	97,15	92,00
	LR(mm)	4,22	4,15	4,90	4,00	4,10	4,00	4,15	4,00
	LH(mm)	1,77	1,65	1,62	1,55	1,76	1,76	1,72	1,73
2009	IG (%)	100	97,49	96,52	82,49	91,11	92,24	92,93	95,51
	LR(mm)	4,15	4,32	4,35	4,30	4,20	4,40	4,20	4,40
	LH(mm)	1,67	1,76	1,76	1,78	1,57	1,60	1,32	1,92

		50%							
		Control	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
2008	IG (%)	100	89,10	89,23	90,03	90,31	95,34	93,45	92,23
	LR(mm)	4,22	4,32	4,20	4,34	4,23	4,25	4,95	4,10
	LH(mm)	1,77	1,75	1,72	1,75	1,76	1,78	1,73	1,73
2009	IG (%)	100	93,48	93,62	92,39	95,16	91,28	92,94	93,56
	LR(mm)	4,15	4,24	4,25	4,20	4,29	4,45	4,34	4,26
	LH(mm)	1,67	1,87	1,57	1,86	1,95	1,68	1,85	1,39

Anexo 8. Valores de pH y conductividad eléctrica (CE) de muestras antes de ser evaluadas mediante el ensayo de inhibición en luminiscencia en *Vibrio fischeri*

Muestra	pH	CE
Grupo 1. Mezclas relacionadas con la agricultura		
Extractos acuosos		
Suelo control	6,69	85,65 µS/cm
Suelo + lodo secado térmicamente	6,65	122,4 µS/cm
Suelo + lodos compostado	7,03	156,6 µS/cm
Suelo + compost de RSU	7,15	145,8 µS/cm
Lodo secado térmicamente	5,58	2,96 mS/cm
Lodo compostado	6,66	2,66 mS/cm
Compost de RSU	7,65	3,69 mS/cm
Extractos diclorometánicos		
Suelo control	7,77	83,4 µS/cm
Suelo + lodo secado térmicamente	6,97	12,53 µS/cm
Suelo + lodos compostado	7,23	134,3 µS/cm
Suelo + compost de RSU	7,39	121,5 µS/cm
Lodo secado térmicamente	5,62	330 µS/cm
Lodo compostado	6,55	2,95 mS/cm
Compost de RSU	7,82	3,57 mS/cm
Grupo 2. Mezclas destinadas a la valorización energética		
Extractos acuosos		
Lodo secado térmicamente de origen industrial-Madrid	6,69	1739 µS/cm
Lodo secado térmicamente de origen urbano-Valladolid	7,45	1401 µS/cm
Extractos diclorometánicos		
Lodo secado térmicamente de origen industrial-Madrid		1220 µS/cm
Lodo secado térmicamente de origen urbano-Valladolid		1322 µS/cm
Grupo 3. Líquidos de pirólisis (Fase inferior)		
Madrid 450°C	8,97	531 µS/cm
Madrid 530°C	9,4	597 µS/cm
Madrid 650°C	9,21	650 µS/cm
Valladolid 450°C	8,21	32,7 µS/cm
Valladolid 530°C	8,24	43,6 µS/cm
Valladolid 650°C	8,12	105,6 µS/cm

Anexos

Anexo 9. Mutagenicidad de lixiviados de suelos enmendados con lodos. Nº de revertientes (desviación estándar). Concentración de evaluación, 25% (v/v).

Tratamientos	-S9				+S9			
	TA98	TA100	TA102	TA104	TA98	TA100	TA102	TA104
Control	22 (0,58)	116 (1,15)	283 (1,00)	315 (2,52)	29 (0,58)	137 (1,00)	288 (1,00)	365 (2,52)
2008								
Jun	23 (1,53)	118 (0,58)	285 (0,58)	315 (1,15)	29 (1,53)	138 (1,53)	288 (0,58)	366 (3,79)
Jul	23 (1,15)	117 (1,15)	282 (0,58)	320 (1,53)	27 (4,04)	138 (1,15)	287 (2,31)	366 (1,73)
Ago	23 (1,53)	117 (1,00)	284 (2,08)	316 (1,53)	28 (3,00)	137 (2,08)	288 (2,52)	366 (3,21)
Sep	22 (1,53)	115 (0,58)	283 (2,08)	319 (1,53)	30 (1,53)	137 (0,58)	289 (2,65)	370 (0,58)
Oct	22 (1,53)	117 (2,00)	285 (1,15)	320 (0,58)	28 (3,06)	137 (1,53)	289 (1,00)	364 (2,31)
Nov	23 (1,53)	117 (2,00)	283 (2,08)	320 (1,15)	30 (2,31)	135 (1,73)	289 (1,00)	366 (2,08)
Dic	22 (1,15)	117 (0,58)	285 (1,73)	319 (2,00)	26 (0,00)	136 (1,73)	289 (1,73)	366 (0,58)
2009								
Jun	24 (1,53)	118 (1,53)	283 (0,58)	319 (1,73)	31 (1,15)	135 (1,00)	287 (1,53)	366 (0,58)
Jul	23 (1,00)	116 (1,73)	282 (2,52)	317 (3,79)	30 (0,00)	138 (2,52)	290 (2,52)	366 (3,51)
Ago	21 (0,00)	117 (2,08)	283 (1,73)	318 (3,21)	30 (1,15)	135 (0,58)	285 (0,58)	364 (1,53)
Sep	23 (1,15)	116 (2,08)	282 (2,52)	317 (1,15)	31 (1,00)	138 (1,73)	287 (1,53)	369 (1,00)
Oct	23 (1,53)	116 (2,00)	283 (2,00)	320 (1,00)	29 (0,00)	139 (1,15)	287 (2,08)	365 (1,15)
Nov	23 (1,53)	116 (1,53)	284 (2,31)	317 (2,52)	30 (1,53)	138 (2,65)	287 (1,15)	365 (2,65)
Dic	22 (0,58)	117 (3,00)	283 (1,15)	319 (2,08)	30 (1,53)	139 (1,53)	290 (3,21)	368 (2,08)
Mut.Estándar*	286 (3,06)	2.144 (69,54)	2.213 (12,77)	4.641 (2,65)	1.284 (4,51)	3.665 (5,31)	4657 (6,7)	5678 (6,34)

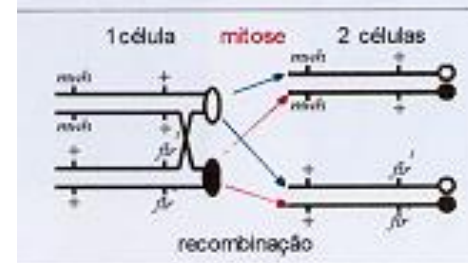
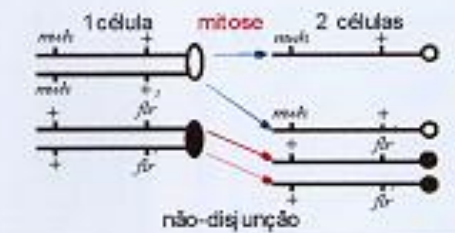
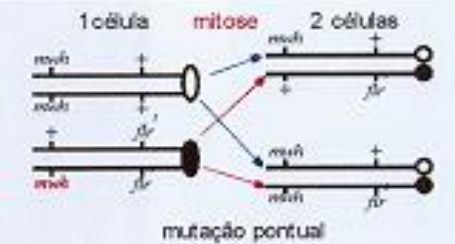
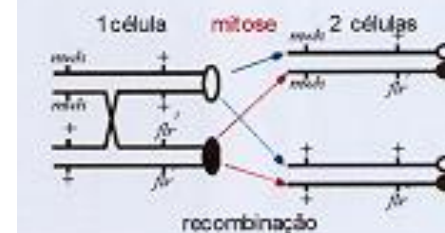
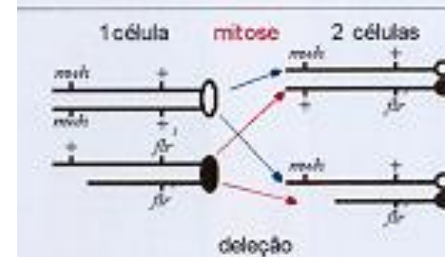
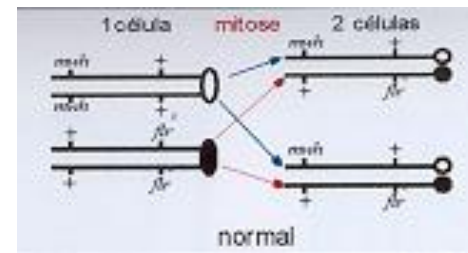
*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

Anexo 10. Mutagenicidad de lixiviados de suelos enmendados con lodos. N° de revertientes (desviación estándar). Concentración de evaluación, 50% (v/v).

Tratamientos	-S9					+S9				
	TA98	TA100	TA102	TA104	TA98	TA100	TA102	TA104		
Control	22 (0,58)	116 (1,15)	283 (1,00)	315 (2,52)	29 (0,58)	137 (1,00)	288 (1,00)	365 (2,52)		
2008	Jun	25 (1,53)	119 (0,58)	289 (0,58)	319 (1,15)	24 (1,53)	138 (1,53)	288 (0,58)	366 (3,79)	
	Jul	24 (1,15)	123 (1,15)	284 (0,58)	317 (1,53)	27 (4,04)	138 (1,15)	287 (2,31)	366 (1,73)	
	Ago	23 (1,53)	124 (1,00)	283 (2,08)	318 (1,53)	23 (3,00)	137 (2,08)	288 (2,52)	366 (3,21)	
	Sep	25 (1,53)	126 (0,58)	289 (2,08)	317 (1,53)	24 (1,53)	137 (0,58)	289 (2,65)	370 (0,58)	
	Oct	24 (1,53)	132 (2,00)	288 (1,15)	320 (0,58)	26 (3,06)	137 (1,53)	289 (1,00)	364 (2,31)	
	Nov	26 (1,53)	128 (2,00)	287 (2,08)	317 (1,15)	27 (2,31)	135 (1,73)	289 (1,00)	366 (2,08)	
	Dic	27 (1,15)	128 (0,58)	289 (1,73)	319 (2,00)	29 (0,00)	136 (1,73)	289 (1,73)	366 (0,58)	
	Jun	24 (1,53)	118 (1,53)	283 (0,58)	319 (1,00)	31 (1,15)	135 (1,53)	287 (0,58)	376 (1,73)	
2009	Jul	23 (1,00)	116 (1,73)	282 (2,52)	317 (2,52)	30 (0,00)	138 (2,52)	285 (1,15)	388 (3,79)	
	Ago	21 (0,00)	117 (2,08)	283 (1,73)	318 (0,58)	30 (1,15)	135 (0,58)	289 (1,00)	379 (3,21)	
	Sep	23 (1,15)	116 (2,08)	282 (2,52)	317 (1,73)	31 (1,00)	138 (1,53)	291 (1,53)	392 (1,15)	
	Oct	23 (1,53)	116 (2,00)	283 (2,00)	320 (1,15)	29 (0,00)	139 (2,08)	289 (1,73)	378 (1,00)	
	Nov	23 (1,53)	116 (1,53)	284 (2,31)	317 (2,65)	30 (1,53)	138 (1,15)	284 (1,73)	388 (2,52)	
	Dic	22 (0,58)	117 (3,00)	283 (1,15)	319 (1,53)	30 (1,53)	139 (3,21)	290 (1,00)	398 (2,08)	
	Mut.Estándar*	286 (3,06)	2.144 (69,54)	2.213 (12,77)	4.641 (2,65)	1.284 (4,51)	3.665 (5,31)	4657 (6,7)	5678 (6,34)	

*Mutágenos estándar, TA98: 4NQO (0.5 µg/placa); TA100 y TA102: MMS (1 µg/placa); TA104: MG (50 µg/placa)

Constitución genética normal del cromosoma N° 3
Alteraciones genéticas que expresan las Manchas Simples Pequeñas y las Manchas simple Grandes
Alteración genética que expresa la Mancha Gemela



Anexo 11. Esquemas genéticos de acontecen en el cromosoma N° 3 de *Drosophila melanogaster*, cuando la muestra a ensayar ejerce efectos sobre el material genético. (Rodríguez, H., 2002)